Alexandre Aluizio Costa Machado

**Manifestações neurológicas na doença de
Wilson : estudo clínico e correlações genotípicas**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Neurologia

Orientador: Prof. Dr. Egberto Reis Barbosa

São Paulo

2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Machado, Alexandre Aluizio Costa

Manifestações neurológicas na doença de Wilson : estudo clínico e correlações
genotípicas / Alexandre Aluizio Costa Machado. -- São Paulo, 2008.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Departamento de Neurologia.

Área de concentração: Neurologia.

Orientador: Egberto Reis Barbosa.

Descritores: 1.Degeneração hepatolenticular 2.Manifestações neurológicas
3.Genótipo 4.Mutação

USP/FM/SBD-320/08

Dedicatória

Aos pacientes e suas famílias,
que sempre participaram e colaboraram irrestritamente na realização do estudo

À Alessandra,
que com amor, sempre estimulou e compartilhou todas as etapas deste estudo

À Sofia,
minha fonte de inspiração, e um novo sentido na minha vida

Aos meus pais Aluizio e Bernadete,
pela dedicação contínua, abnegação e paixão inesgotável pelos filhos

Aos meus irmãos: Aluizio, Pedro e Ana Carolina,
que sempre compartilharam comigo dos momentos bons e também dos difíceis

À Ivone,
companheira desde sempre, exemplo de dedicação irrestrita

Agradecimentos

Ao meu amigo e orientador **Prof. Dr. Egberto Reis Barbosa** pela oportunidade de conviver e compartilhar com todo o seu conhecimento e experiência e pelo constante estímulo, apoio e presença em todas as etapas deste estudo.

À **Dra. Marta Mitiko Deguti** que colaborou ativamente nas várias etapas do projeto e realizou o estudo genético dos pacientes, sem o qual esta Tese não seria possível.

Ao colegas **Prof. Dr. Eduardo Luiz Rachid Cançado, Prof. Dr. Luiz Alberto Bacheschi, Dr. Sergio Rosemberg, Dra. Mariana Spitz, Dr. Leandro Tavares Lucato, Dra. Laura Silveira Moriyama e Dra. Chien Hsin Fen**, pelas valiosas participações nos artigos publicados.

Ao **Prof. Dr. Hartmut Schmidt**, do campus Charité-Mitte da Universidade Humboldt (Berlim, Alemanha), que generosamente participou na elaboração do artigo sobre o estudo de correlações clínico-genéticas.

Ao **Prof. Dr. Fernando Kok, Dr. João Carlos Papaterra Limongi e Dr. Dagoberto Calegari**, componentes da banca de qualificação, pela preciosa e generosa análise crítica.

À **Dra. Mônica Santoro Haddad, Dra. Márcia Rubia e a todos os colegas médicos, fisioterapeutas, fonoaudiólogos, secretários, e voluntários do Grupo de Estudos de Distúrbios do Movimento do Hospital das Clínicas** com quem eu tenho compartilhado as atividades e convivido nos últimos seis anos.

Ao **Dr. Raymundo Soares Azevedo e Rogério Ruscitto do Prado** pela assessoria na análise estatística dos dados deste estudo.

À **Delmar de Lima Freire** pela minuciosa revisão e sugestões na elaboração da Tese.

À **Vanessa Pinato Gaspar** pela gentileza de revisar o resumo em inglês.

Ao **Prof. Dr. Ricardo Nitrini** que cria um ambiente fértil à pesquisa, no seu exemplo de dedicação à pós-graduação.

Ao **Prof. Dr. Milberto Scaff e à Clínica Neurológica** pela minha formação.

À **CAPES** pelo incentivo ao desenvolvimento deste trabalho através de uma Bolsa de Doutorado.

Ao meu pai **Dr. Aluizio de Barros Barreto Machado**, exemplo de perseverança e inspiração para vida acadêmica, permitiu-me trilhar o caminho certo e participou na elaboração da Tese com valiosas sugestões e revisões

Suporte Financeiro

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes): bolsa para doutorando no período de janeiro de 2005 a outubro de 2008.

Artigos

Os artigos originais (Anexo 8.1), descritos abaixo e indicados no texto por algarismos romanos, fundamentam esta tese.

- I **Machado AAC**, Chien HF, Deguti MM, Cançado E, Azevedo RS, Scaff M, Barbosa E. Neurological manifestations in Wilson's disease: Report of 119 cases. *Mov Disord* 2006; 21: 2192-2196.
- II Barbosa ER, Moriyama LS, **Machado AAC**, Bacheschi LA, Rosemberg S, Scaff M. Wilson's disease with myoclonus and white matter lesions. *Parkinsonism Relat Disord* 2007;13: 185-188.
- III **Machado AAC**, Deguti MM, Caixeta K, Spitz M, Lucato LT, Barbosa ER. Mania as the first manifestation of Wilson Disease. *Bipolar Disorders* 2008; 10: 447–450.
- IV **Machado AAC**, Deguti MM, Cançado E, Genschel J, Bochow B, Schmidt H, Barbosa ER. Neurological manifestations and *ATP7B* mutations in Wilson disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2008; 14 : 246- 249.

Sumário

Lista de Artigos

Lista de Tabelas

Lista de Gráficos

Figura

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Considerações Gerais	5
2.2 Aspectos Genéticos	5
2.3 Fisiopatologia	8
2.4 Quadro Clínico	12
2.5 Diagnóstico.....	20
2.6 Tratamento	21
3. OBJETIVOS.....	23
4. MÉTODOS.....	25
4.1 Manifestações neurológicas (I, II e III)	26
4.2 Genótipo (IV)	29
4.3 Análise estatística (I e IV)	29
5. RESULTADOS.....	31
5.1 Manifestações neurológicas (I)	32
5.2 Genótipo (IV)	35
6. DISCUSSÃO	41
6.1 Manifestações neurológicas (I, II e III)	42
6.2 Genótipo (IV)	51
7. CONCLUSÕES	57
8. ANEXOS	60
8.1 Artigos	61
8.2 Aprovação do projeto pela Comissão de Ética do HC/FMUSP.....	78
8.3 Lista dos pacientes	79
9. REFERÊNCIAS	82

Lista de Tabelas

Tabela 1: Protocolo de avaliação da Clínica Neurológica (HC/FMUSP)	28
Tabela 2: Manifestações neurológicas em 119 pacientes	33
Tabela 3: Manifestações neurológicas atípicas	34
Tabela 4: Manifestações psiquiátricas	35
Tabela 5: Mutações encontradas e manifestações neurológicas em 41 pacientes	37
Tabela 6: Dados demográficos e manifestações neurológicas conforme o genótipo	40
Tabela 7: Tempo médio entre o início das manifestações neurológicas e o diagnóstico definitivo nas últimas cinco décadas	43
Tabela 8: Estudos sobre manifestações neurológicas na doença de Wilson	44

Lista de Gráficos

Gráfico 1: Número de pacientes conforme idade de início das manifestações neurológicas e sexo	42
Gráfico 2: Frequência das principais manifestações neurológicas conforme faixa etária	46

Figura

Figura 1: Fisiologia do transporte do cobre no interior do hepatócito.....	10
---	----

Resumo

Machado AAC. *Manifestações neurológicas na doença de Wilson: estudo clínico e correlações genotípicas* [tese] São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008. 94p.

A doença de Wilson, moléstia hereditária, caracteriza-se pela deficiência de excreção de cobre pelo fígado, originária da mutação do gene *ATP7B*. As manifestações neurológicas na doença de Wilson são pleomórficas, observando-se distúrbios do movimento com início insidioso e em idade variável - geralmente na segunda ou terceira décadas de vida. Este estudo, dividido em duas partes, descreve as manifestações neurológicas iniciais em 119 pacientes com doença de Wilson (93 casos-índice e 26 familiares acometidos), avaliados entre 1963 e 2004 – dos quais 109 foram através de análise retrospectiva dos prontuários médicos, enquanto aos 10 pacientes restantes se dispensou avaliação clínica prospectiva, a partir de 2002. O início dos sintomas ocorreu na média etária dos 19,4 anos (7-37), e o tempo médio do surgimento dos sintomas ao diagnóstico de 1,1 +/- 1,2 anos (0-5 anos). Entre as manifestações neurológicas mais frequentes, observaram-se: disartria (91%), distúrbios da marcha (75%), *risus sardonicus* (72%), distonia (69%), rigidez (66%), tremor (60%) e disfagia (50%). A incidência das manifestações coreia e atetose, 16% e 14%, respectivamente, foi baixa. Manifestações atípicas incluíram convulsões (4,2%) e sinais piramidais (3%). A segunda parte do estudo trata da investigação do genótipo *ATP7B* em 41 pacientes e suas possíveis correlações com o fenótipo neurológico. Encontraram-se 23 mutações distintas, a mais comum das quais (p.A1135fs) com frequência alélica de 31,7%. Expressiva associação ($p < 0,05$) se deu entre essa mutação e a manifestação disfagia, ainda que limitada por amostra restrita de pacientes. Também sugestiva foi a associação entre a mutação p.A1135fs e quadros neurológicos precoces e graves. Este é o primeiro estudo a comparar o genótipo *ATP7B* com as manifestações neurológicas na doença de Wilson.

Descritores. 1.Degeneração hepatolenticular 2.Manifestações neurológicas
3.Genótipo 4.Mutação

Summary

Machado AAC. Neurological manifestations in Wilson disease: clinical study and genotype correlations [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2008. 94p.

Wilson disease, a rare inborn metabolic error, is characterized by deficient hepatic copper excretion, due to mutations in *ATP7B* gene. Neurological manifestations may vary, although there is commonly a movement disorder starting in the second or third decade of life. This study is divided in two parts, and it describes the neurological manifestations in 119 patients with Wilson disease (93 index cases and 26 affected family members), which were seen between 1963 and 2004 – a retrospective analysis in 109 medical records and prospective clinical evaluation in 10 patients since 2002. The average age of symptoms onset was 19.4 years (ranging from 7 - 37 years), and the mean time between the first symptom and diagnosis was 1, 1 +/- 1, 2 years. The most frequent neurological manifestations observed were: dysarthria (91%), gait disturbance (75%), *risus sardonicus* (72%), dystonia (69%), rigidity (66%), tremor (60%), and dysphagia (50%). Less frequent manifestations were chorea (16%), and athetosis (14%). Rare neurological presentations were seizures (4,2%), and pyramidal signs (3%). In the second part of this study, we ascertain *ATP7B* genotype correlations with distinct neurological phenotypes in 41 Wilson disease patients. A total of 23 distinct mutations were detected, and the p.A1135fs frameshift had the highest allelic frequency (31.7%). An association between a p.A1135fs mutation and dysphagia was detected ($p < 0,05$), but the limited number of patients restricts valuable conclusions. This analysis also suggests an association between this mutation and early and severe neurological presentation. This present study is the first one to evaluate an *ATP7B* genotype correlation with specific neurological profile in Wilson disease.

Descriptors. 1.Hepatolenticular degeneration 2.Neurologic manifestations
3.Genotype 4.Mutation

1. INTRODUÇÃO

Manifestações neurológicas na doença de Wilson (DW), ou degeneração hepatolenticular, caracterizadas desde a descrição de Wilson em 1912, continuam objeto da investigação médica. Um número crescente de publicações as descrevem hoje sob novas formas de apresentação. Mas, a raridade da doença e a variabilidade de expressão clínica contribuem para manter as dificuldades diagnósticas.

A DW ilustra uma situação rara na Medicina: doença hereditária, potencialmente fatal, porém de tratamento relativamente simples, muitas vezes tem a evolução de seus sintomas revertida, quando se chega ao diagnóstico correto no início do quadro. O reconhecimento precoce das manifestações neurológicas na DW assume importância decisiva para o prognóstico.

O Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC/FMUSP), centro de referência no tratamento dessa moléstia, há cinco décadas assiste a um número expressivo de portadores da DW. A Clínica Neurológica, sob a orientação dos professores Horácio Martins Canelas, Milberto Scaff e Egberto Reis Barbosa, instituiu uma das linhas tradicionais de pesquisa da matéria e edita várias publicações de nível internacional. Entretanto, como em toda moléstia incomum, os estudos sobre DW descrevem casuísticas com poucos pacientes, principalmente no que concerne às características das suas manifestações neurológicas.

Outro tópico relevante, a associação entre fenótipo e genótipo na DW, tema controverso, ocupa, há anos, espaço nos meios acadêmico-científicos de divulgação. A heterogeneidade da apresentação clínica na DW é fato intrigante. O papel das

diferentes mutações na determinação do fenótipo continua polêmico e a maioria dos estudos mostra resultados inconclusivos.

Quanto à correlação entre as formas de apresentação neurológica e o genótipo *ATP7B*, ressurte-se, até o momento, de qualquer estudo sistematizado. O fato se deve, em parte, à quantidade significativa de mutações, à raridade da doença e à falta de um protocolo validado de avaliação neurológica da DW. Tais fatores dificultam estudos comparativos.

A experiência acumulada pela Clínica Neurológica do HC/FMUSP, fruto do grande número de pacientes cadastrados e em acompanhamento, permitiu que este estudo avaliasse as manifestações neurológicas da DW, a partir de uma amostra significativa de doentes e do estabelecimento de correlações entre fenótipo e genótipo em parte da casuística. Após a revisão dos principais dados da literatura a respeito do tema, em particular daqueles referentes às manifestações neurológicas e aspectos genéticos na DW, segue-se a apresentação do material e da metodologia de investigação, a exposição dos resultados obtidos, sua discussão e, por fim, a apresentação das conclusões.

O estudo foi realizado no Grupo de Estudos de Distúrbios do Movimento da Divisão de Clínica Neurológica do HC/FMUSP. A Divisão de Clínica de Gastroenterologia e Hepatologia da instituição (Dra. Marta Mitiko Deguti e Prof. Dr. Eduardo Luiz Rachid Cançado) e o *Campus* Charité-Mitte da Universidade Humboldt, de Berlim, Alemanha (Prof. Dr. Hartmut Schmidt), ofereceram valiosa cooperação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Considerações Gerais

A DW, descrita como entidade nosológica por Samuel Alexander Kinnier Wilson (1912), é moléstia hereditária, autossômica e recessiva do metabolismo do cobre. Patologia rara, compromete, preferencialmente, as funções hepática e neurológica, com prevalência estimada de 1:30000 (Stremmel et al, 1991; Relly et al, 1993). A compreensão da patogênese, biologia molecular e genética da DW avançou significativamente nas duas últimas décadas. Suas manifestações clínicas surgem, geralmente, na segunda e terceira décadas de vida. As pessoas afetadas apresentam acúmulo excessivo de cobre no fígado, em razão da excreção deficiente do metal na bile. A moléstia evolui progressivamente, tornando-se fatal nos casos não diagnosticados.

2.2 Aspectos Genéticos

O gene *ATP7B* relacionado ao defeito básico na DW situa-se no braço longo do cromossomo 13 (*locus* 13q 14-21) (Bull et al, 1993; Tanzi et al, 1993; Yamaguchi et al, 1993). Ele codifica a produção da proteína homônima ATP7B, uma ATPase (adenosina trifosfatase), tipo P, relacionada ao transporte de metais; se expressa em níveis maiores no fígado e no rim, menores no cérebro e pouco

significativos em outros órgãos (**Dufour et al, 1997**). A proteína ATP7B, localizada nos canais de Golgi dos hepatócitos, transporta e liga o cobre à apoceruloplasmina, além de, na presença excessiva do metal, proceder à sua excreção na bile (**Kitzberger et al, 2005**).

Mais de 350 mutações no gene *ATP7B* já foram identificadas até hoje (www.medicalgenetics.med.ualberta.ca/wilson/index.php). Algumas mutações têm maior predominância em determinadas populações. Na Europa do Norte, Centro e Leste, até 38% dos portadores de DW apresentam a substituição p.H1069Q na forma homozigota no éxon 14 do gene *ATP7B* (**Caca et al, 2001**). A mutação p.R778L, mais comum nas populações orientais, foi encontrada em 28 a 44% dos pacientes asiáticos (**Liu et al, 2004**). O primeiro estudo do genótipo de pacientes com DW na América do Sul (**Deguti, 2004**) avaliou 60 brasileiros; encontrou 25 mutações, 12 descritas pela primeira vez; e a mais freqüente foi a mutação p.A1135fs (34,8%), seguida da mutação p.L708P (14,1%). Outras registraram freqüência inferior a 5%.

Algumas publicações sugerem a associação entre genótipo e manifestações hepáticas na DW. Ao analisar em estudo populacional o genótipo em 75 pacientes com DW, **Liu et al (2004)** constataram associação entre a mutação p.R778L e a presença de manifestações hepáticas, como apresentação clínica inicial na DW - enquanto **Leggio et al (2007)** analisaram o genótipo em 19 membros de uma mesma família, em quatro gerações, e descreveram uma nova mutação denominada p.T1288R. Nessa família, três membros com genótipo homozigoto para esta mutação tinham o diagnóstico de DW e a presença de quadro hepático leve. Apesar da casuística limitada, os autores sugerem associação entre a mutação p.T1288R e o surgimento de manifestações hepáticas.

Os resultados conflitam, quando se trata da associação entre genótipo e manifestações neurológicas. A mutação p.H1069Q tornou-se foco de várias investigações acerca da correlação clínico-genética em razão de sua alta frequência. Em estudo recente de meta-análise, abrangendo 577 pacientes, **Stapelbroek et al (2004)** sugerem a associação desta mutação com quadro neurológico e início tardio. Na casuística de **Panagiotakaki et al (2004)**, a mutação p.H1069Q também foi associada à idade de início das manifestações tardia (18,7 anos) e presença de manifestações neurológicas. Porém, outros estudos não mostram essa relação, como na descrição de **Vrabelova et al (2005)**, onde, na análise de 227 pacientes, não se observou relação entre a mutação p.H1069Q (frequência alélica de 57%) e o fenótipo dos pacientes. Da mesma forma, **Shah et al (1997)**, investigando o genótipo em 141 pacientes com DW, em diversas populações, não encontraram relação entre idade de início e tipo de manifestação clínica (hepática ou neurológica) com a mutação p.H1069Q, presente em 38% da amostra.

Em estudo ímpar, destinado a correlacionar genótipo-quadro neurológico **Hermann et al (2002)** avaliaram a relação entre parâmetros de movimentos finos das mãos durante a escrita, que espelhariam, funcionalmente, os circuitos dos núcleos da base e cerebelo, e o genótipo *ATP7B* em 36 pacientes com DW. A análise dividiu os pacientes em grupos de genótipos, conforme a ausência ou presença em homozigose e/ou heterozigose da p.H1069Q, que era a mutação predominante. Na série estudada, os autores não encontraram tal relação e também não observaram correlação do genótipo com outros fatores, como idade de início, presença de manifestações neurológicas e o sexo dos pacientes. Um possível fator interferente neste estudo seria o tratamento regular para DW, introduzido dois anos antes, o que

poderia ter levado à recuperação motora variável. Além deste relato, não encontramos na literatura nenhum outro estudo a respeito da correlação entre genótipo dos pacientes com DW e manifestações neurológicas distintas.

2.3 Fisiopatologia

O oligoelemento cobre, essencial para o funcionamento celular (**Pena et al, 1999**), atua como cofator em vários sistemas enzimáticos. Substância tóxica, o cobre livre é capaz de levar a danos irreversíveis e à morte celular. Sistemas específicos de transporte intracelular permitem o tráfico e armazenamento do cobre, a formação de proteínas ligadas a ele (cuproproteínas) e a excreção do excesso deste metal, evitando sua toxicidade celular.

A necessidade diária de cobre para o corpo humano, aproximadamente de um a dois miligramas, obtidos via dieta, é absorvido pelas células intestinais, transportado para o fígado e captado pelos hepatócitos. Nessas células, a proteína ATOX1 (chaperona) transporta o cobre para diversas estruturas intracelulares (**Valentine et al, 1997**). Parte dele se liga à metalotioneína para armazenamento. Outra parcela à proteína ATP7B, reguladora da excreção do cobre pelos canais biliares e à ligação do mineral à apoceruloplasmina para formar a ceruloplasmina (**Yang et al, 1997**). A ceruloplasmina é uma α_2 -glicoproteína, que transporta seis moléculas de cobre (**Yang et al, 1997**). Essa proteína carrega cerca de 90% do cobre plasmático, sendo a fonte da substância para outros órgãos, como cérebro e rins (**Das et al, 2006**). Na DW, face à redução ou disfunção da ATP7B, níveis reduzidos de

cobre são incorporados à apoceruloplasmina (**Gibbs et al, 1979**). Com redução da disponibilidade de cobre, o hepatócito deixa de produzir à apoceruloplasmina, gerando somente uma proteína instável, rapidamente degradada, resultando em hipoceruloplasminemia (**Gitlin et al, 1992**).

A rota primária de eliminação do cobre no sistema gastrointestinal é a excreção biliar. A falha na excreção do cobre nos canais biliares, secundária à disfunção da ATP7B, leva ao acúmulo tóxico do cobre nos hepatócitos. O acúmulo excessivo agride a mitocôndria, e leva à lesão oxidativa celular e ao aumento do cobre livre. No processo de morte celular, além do acúmulo de radicais livres, descreve-se o papel do cobre na ativação da esfingomielinase ácida e na liberação celular de ceramida, contribuindo para o processo de apoptose (**Lang et al, 2007**).

Quando a capacidade de armazenamento é ultrapassada ocorre a liberação de cobre na circulação sanguínea, levando ao processo tóxico em outros tecidos do corpo (**Das et al, 2006**). A maior suscetibilidade do cérebro ao excesso de cobre em relação a outros órgãos é outra questão não esclarecida. **Hayashi et al (2006)** demonstraram em modelo animal que a lesão oxidativa do DNA no sistema nervoso central ocorre com acúmulo de cobre inferior ao necessário para danificar o DNA no fígado. **Brewer (2001)** afirma que a susceptibilidade de determinadas regiões do cérebro pode se dever à menor capacidade de resposta da metalotioneína neuronal ao excesso de cobre e, também, a mecanismos oxidantes de defesa menos eficazes.

Figura 1: Fisiologia do transporte do cobre no interior do hepatócito; o cobre entra no hepatócito através do transportador CTR1, a seguir, se distribui através da chaperona ATOX1 para ser armazenado com a metalotioneína, ou transportado pela proteína ATP7B para incorporação na apoceruloplasmina, ou excreção na bile.

Os mecanismos de lesão neuronal secundários ao depósito de cobre também não são bem conhecidos. Um número crescente de evidências, contudo, demonstra o importante papel dos metais na fisiologia do sistema nervoso central. As cuproproteínas formadoras de complexos bio-inorgânicos possuem propriedades oxidantes e antioxidantes que teriam impacto na função neuronal e no desencadeamento de processos neurodegenerativos. Duas proteínas relacionadas a processos neurodegenerativos têm sido descritas como cuproproteínas: a precursora do amilóide, relacionada com a doença de Alzheimer, e a priônica, relacionada à doença de Creutzfeldt–Jakob. (Ferenci, 2004).

O papel fundamental do cobre também pode ser inferido observando-se situações com deficiência deste metal no sistema nervoso central. Na síndrome de Menkes, condição mais rara que a DW, a passagem do cobre pela membrana basolateral do intestino está comprometida, de forma que sua absorção fica prejudicada, determinando um déficit desse metal no organismo. O quadro clínico é caracterizado por retardo do desenvolvimento psicomotor, epilepsia de difícil controle, além de alterações cutâneas, ósseas e arteriais. A evolução é invariavelmente fatal dentro dos primeiros anos de vida (**Reed et al , 1984**).

Além do cobre, o ferro pode concentrar-se no sistema nervoso central, na ausência da ceruloplasmina, substância que oxida a forma tóxica do ferro em sua forma não tóxica (**Patel et al, 2002**). Na aceruloplasminemia, doença neurodegenerativa autossômica recessiva, a ausência de ceruloplasmina leva ao acúmulo de ferro no sistema nervoso central (**Kono et al, 2006**). **Bruehlmeier et al (2000)** demonstraram o aumento da concentração de ferro (ligado a transferrina) no sistema nervoso central, em pacientes com DW, através de estudo com imagem funcional (tomografia por emissão de pósitrons).

Borjigin et al (1999) destacam algumas regiões cerebrais, nas quais a ATP7B é funcionalmente ativa, como na glândula pineal, o que poderia contribuir para o comprometimento neuronal, além do efeito tóxico do cobre, proveniente da circulação. Outra enzima importante no sistema nervoso central, a dopamina beta-hidroxilase, também dependente do cobre, pode ter relação com o acometimento preferencial dos núcleos da base na DW (**Ferenci, 2004**).

No estudo anátomo-patológico do cérebro, os achados macroscópicos são mais importantes nos núcleos da base com degeneração cística e cavitações, sendo o

núcleo lenticular o mais acometido. Afora os núcleos da base, a DW pode também levar à dilatação ventricular e à atrofia cerebral generalizada (**Lewitt et al, 2002**). Os achados microscópicos incluem inchaço endotelial capilar, proliferação da glia com predomínio de células de Alzheimer tipo II e lesão de fibras mielinizadas. (**Lewitt et al, 2002**). Outro achado patológico comum na DW são as células de Opalski, que parecem ter origem na glia (**Bertrand et al, 2001**).

2.4 Quadro Clínico

A DW se apresenta sob várias formas clínicas, desde as manifestações mais comuns, como hepáticas e neuropsiquiátricas, às mais raras (nefropatia, distúrbios osteoarticulares, alterações dermatológicas e cardiopatias). Todo o paciente com DW, independentemente da presença ou não de manifestações clínicas, apresenta algum grau de disfunção hepática. Doença hepática crônica pode preceder manifestações neurológicas por muitos anos (**Steindl et al, 1997**). Manifestações hepáticas geralmente ocorrem entre os oito e 18 anos e cirrose pode estar presente até na infância. Entretanto, hepatopatia pode não ser sintomática, até a quarta ou quinta década de vida. O quadro hepático pode evidenciar-se apenas por alterações nas transaminases em pacientes assintomáticos e, nos demais, por hepatite crônica ou aguda, cirrose ou insuficiência hepática aguda (**Pfiffer, 2004**).

Em 40 a 60% dos pacientes com DW, a primeira apresentação clínica são manifestações neurológicas (**Brewer, 2001**). O acometimento do sistema nervoso central se constata predominantemente por quadro motor com distúrbios do movimento,

decorrentes de lesão no circuito dos núcleos da base, ou de conexões cerebelares, tais como: distonia, tremor, rigidez, bradicinesia, coreia e ataxia (**Barbosa, 1999**).

Os primeiros casos descritos de DW se caracterizavam pela presença de manifestações neurológicas. Owen (**1981**), Scheinberg et al (**1984**), Pfeiffer (**2004**) e Walshe (**2006**) atribuem a Von Frerichs¹ o primeiro relato de um caso de DW, em 1861. Tratava-se de paciente do sexo masculino com cirrose hepática associada a violentos tremores e convulsões, que faleceu aos 10 anos de idade. Posteriormente, Westphal (**1883**) e Strumpell (**1898**) descreveram pacientes com quadro de tremor exuberante, semelhante ao da esclerose múltipla, o qual denominaram pseudo-esclerose”. Em 1912, Wilson descreveu a degeneração lenticular progressiva em 12 pacientes com quadro neurológico (**Wilson, 1912**). Apesar de limitado à descrição de quatro casos observados pessoalmente, um *post mortem*, e outros oito coletados da literatura, o quadro clínico foi descrito de maneira abrangente, tal qual o conhecemos hoje, 95 anos depois. Wilson estabeleceu, corretamente, a ligação entre acometimento do fígado e do sistema nervoso central.

Posteriormente, Hall (**1921**), ao revisar 64 casos da literatura e estudar mais quatro pessoalmente, concluiu que parte dos pacientes descritos por Westphal, Strumpell e os casos de Wilson constituíam a mesma entidade nosológica, a qual denominou de degeneração hepatolenticular, evidenciando duas formas de apresentação do quadro neurológico. Nas décadas seguintes, diversos autores procuraram ainda caracterizar síndromes clínicas conforme o tipo de manifestação neurológica. Em 1960, Konovalov², citado por Hoogenraad (**1996**), e em 1987

¹ Frerichs FT. *A Clinical Treatise on Disease of the Liver*. London: Trans Murchison C New Sydenham Soc;1861. p.60-63

² Konovalov NV. *Hepato-Cerebral Dystrophy*. Moscow: Medgiz; 1960: p.555.

Marsden, classificaram as manifestações neurológicas na DW em três síndromes, conforme a manifestação principal: distonia, tremor ou parkinsonismo.

Em 1964, Denny-Brown descreveu 18 casos de DW e salientou que as duas formas descritas por Westphal e Wilson tinham evolução e resposta ao tratamento muito diferentes. Esse autor descreveu a forma pseudo-esclerótica com tremor e disartria, idade de início variável entre a segunda e terceira décadas com evolução lenta e progressiva, ao longo de vários anos, mesmo sem tratamento. Denny-Brown relatou oito casos vistos por ele - todos apresentaram melhora clínica significativa com uso de quelante do cobre. Quanto à forma dita degeneração lenticular progressiva de Wilson ou forma juvenil de Wilson, começa tipicamente entre sete e 15 anos, geralmente com distonia como primeira manifestação. Nestes pacientes é mais comum o *risus sardonicus*. Em contraste com a forma pseudo-esclerótica em 10 pacientes com a forma juvenil de Wilson, a evolução clínica foi desalentadora, pois evoluiu para óbito em período variável de meses a poucos anos. O autor enfatiza ser a presença de postura distônica fator de mau prognóstico, relacionado à lesão putaminal. E conclui: a relação entre comprometimento hepático e manifestações neurológicas é obscura, as duas formas de apresentação neurológica (pseudo-esclerótica e juvenil de Wilson) têm evolução e prognóstico diversos e, talvez, fisiopatologias distintas. A diferença marcante das duas formas de apresentação neurológica em termos prognósticos é compartilhada também por Strickland et al (1975).

As tentativas de classificar o comprometimento neurológico na DW sempre foram limitadas pela raridade da doença e pela grande diversidade de apresentação do comprometimento do sistema nervoso central. Denning et al (1989) em estudo único buscaram estabelecer estatisticamente a presença de subgrupos clínicos na DW,

inclusive quanto à presença de subgrupos de apresentação neurológica. O autor salienta inicialmente que, apesar de extensas revisões dos aspectos clínicos da DW, há falta de validação estatística; e a maioria das publicações acerca do tema são orientadas por impressões clínicas sem emprego de métodos estatísticos. Dessa forma, baseados em três séries prévias, com 205 casos e casuística própria com 195 casos (casos avaliados pelo Prof. J. Walshe) , eles empregaram métodos de análise estatística para determinar a presença de subgrupos de apresentação clínica. Ficou clara a presença dos subgrupos hepático, neurológico e assintomático. Porém, o autor conclui não ser possível determinar formas de apresentação neurológicas diversas, apesar de alguma evidência da existência de dois subgrupos, justamente pela falta de dados quanto às diversas manifestações individuais neurológicas na maioria das séries avaliadas.

Entre os estudos de classificação das manifestações neurológicas na DW, destaca-se o trabalho realizado por Oder et al (1993) que, estudando 47 pacientes, procuraram correlacionar achados na avaliação neurológica, grau de incapacitação motora, avaliação cognitiva e achados de ressonância nuclear magnética (RNM), com o objetivo de identificar subgrupos de pacientes com manifestações neurológicas. Encontraram três grupos distintos de pacientes, conforme esses parâmetros. O primeiro com disartria, tremor, restrição motora importante e alterações talâmicas na RNM; o segundo com distonia, alteração de personalidade (labilidade afetiva e crítica prejudicada) e lesões no putâmen e globo pálido; e, o terceiro, caracterizado por síndrome parkinsoniana, prejuízo de funções cognitivas e dilatação do terceiro ventrículo. Os autores sugerem, então, a presença de três grupos distintos com características neuropsiquiátricas e de imagem específicas, que poderiam ser úteis na determinação do prognóstico e direcionamento do tratamento

na DW. As conclusões desse estudo têm limitações, ditadas pelo grande número de variáveis em relação à casuística, pequena e demograficamente não representativa, aspectos admitidos pelos próprios autores como causas de possível viés do estudo.

O valor prático das classificações do quadro neurológico é questionado por Pfeiffer (2004), já que, frequentemente, elementos de duas ou três dessas síndromes estão presentes em um mesmo paciente, com sobreposição das várias apresentações neurológicas na evolução do quadro, limitando a utilidade clínica destas classificações. Recentemente, grandes revisões do tema manifestações neurológicas na DW surgiram na literatura. Assim como já salientava Denning (1990), nessas revisões são descritas as manifestações neurológicas com referências a pequenas séries e relatos de casos, geralmente sem expressar estatísticas definitivas. Assim caracterizadas, destacam-se as revisões de Scheinberg (1984), Walshe (1986), Marsden (1987), Hoogenraad (1996), Lewitt et al (2002) e Pfeiffer (2004). Entre essas, a de Hoogenraad é a mais detalhada, explorando as diversas manifestações neurológicas em todas as suas nuances.

Até hoje, poucas são as séries de pacientes da DW com descrição das manifestações neurológicas (Tabela 8). Estudos até à metade do século passado se caracterizavam por descrições extensas e minuciosas do quadro clínico dos pacientes e casuísticas pequenas como nas séries de Homburger et al (1946) e Bickel et al (1957) (Tabela 8). Destaca-se o estudo de Okinaka et al (1961) em que são apresentados 34 pacientes com acometimento do sistema nervoso central em uma amostra total de 62 (Tabela 8). O autor apresenta dados retrospectivos referentes a período de 10 anos no Japão. Na série apresentada por Strickland et al (1975) em uma casuística de 40 pacientes com DW provenientes de Taiwan, manifestações neurológicas estavam

presentes inicialmente em 28 casos (Tabela 8). Como bem descreve o autor, muitos dos casos apresentados não tinham penicilamina disponível para tratamento, o que, provavelmente, explique a gravidade das manifestações neurológicas apresentadas. São relatados 23 pacientes (82%) com demência e 12 (43%) com quadro de “coma”. No estudo de Rubinstein (1987) são mencionados 31 casos de DW com avaliação neurológica pormenorizada (Tabela 8), onde as manifestações clínicas são descritas com escala de graduação da intensidade e guardam correlação com os achados de RNM. Disartria foi a manifestação mais freqüente (97%), apresentando correlação com lesões no putâmen e caudado na RNM. Distonia, segunda manifestação mais comum em 65% dos casos, estava relacionada com lesões putaminais na RNM.

Nos últimos anos, outras séries de pacientes com DW detalharam as diversas manifestações neurológicas. Stremmel et al (1991) relataram experiência de três décadas (1957 a 1989) em hospital universitário de Dusseldorf (Alemanha) onde foram avaliados 51 pacientes com DW, 31 dos quais com apresentação neurológica (Tabela 8). Nessa casuística são descritas as manifestações neurológicas de maneira abrangente, como disartria, tremor, dificuldades à escrita, distúrbio da marcha e astenia. Não existe menção à síndromes distônica ou parkinsoniana (em quatro pacientes porém se observou hipomímia). Manifestações atípicas como cefaléia, tontura e convulsões também são descritas. Em estudo prospectivo na Áustria, Oder et al (1991) avaliaram 45 pacientes com DW, 27 com apresentação inicial neurológica (Tabela 8). O estudo classifica 14 manifestações neurológicas distintas, inclusive com graduação de leve, moderada ou severa. Curiosamente, a manifestação mais comum foi a disdiadococinesia (23 pacientes) e a menos comum a distonia (cinco pacientes). Em estudo mais recente, Bono et al (2002) expõem 21 casos avaliados em

serviço de neurologia no Hospital de Especialidades do Marrocos, entre 1988 a 1999: a maioria dos casos apresentava distonia, parkinsonismo (referido como síndrome extrapiramidal) e tremor (Tabela 8).

O uso de escalas padronizadas para avaliação do quadro neurológico na DW é restrito e poucos trabalhos fazem referência a alguma forma sistematizada de avaliação. Rubinstein (1987) relata uso de escala quantitativa para as manifestações neurológicas descritas em 18 categorias. No Serviço de Neurologia do HC-FMUSP é adotada escala padronizada por Barbosa et al (1991), na qual a avaliação dos pacientes é feita da mesma forma, em escala quantitativa para cada uma das 12 categorias de manifestações neurológicas (ver na seção pacientes e métodos), variando de zero (normal) a três (comprometimento severo). Outros autores, como Oder et al (1993) e Czlonkowska et al (2005) referem o emprego de escalas semelhantes. Em artigo recente, Czlonkowska et al (2007) expõem uma proposta de escala de avaliação dos pacientes com DW e manifestações neurológicas (Unified Wilson Disease Rating Scale – UWDRS). Este estudo é fruto do Consórcio *EuroWilson*, criado na Europa para formar um banco de dados clínicos e genéticos da DW no continente europeu. Nesta nova escala, a avaliação clínica é dividida em três partes: consciência (UWDRS I), história clínica (UWDRS II) e exame neurológico (UWDRS III). Os autores concluíram que, nos próximos dois anos, será avaliada a confiabilidade e validade desta escala.

No Brasil, poucos estudos apresentam casuísticas sobre a DW. Narata et al (2002) descrevem experiência no Serviço de Neurologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal do Paraná, com relato de 30 casos de DW. Nessa casuística, 25 pacientes apresentavam manifestações neurológicas com predomínio de tremor,

síndrome cerebelar e distonia, sem descrição de parkinsonismo. Saliente-se que em três pacientes com manifestação neurológica não foi encontrado o anel de Kayser-Fleischer (K-F). Em série extensa, Barbosa et al **(1985)** descreveram 49 casos com manifestações neurológicas. Os casos relatados neste estudo formam parte da casuística desta tese. Recentemente, vários relatos de casos mencionam apresentações neurológicas atípicas, ampliando o leque de manifestações relacionadas ao acometimento do sistema nervoso central na DW (**Yorio et al, 1997; Lee et al, 1999; Crone et al, 2005**).

Concomitantemente ao acometimento motor, as alterações cognitivas são comuns na DW. São relatadas, principalmente, alterações em funções executivas, processamento visuo-espacial e memória (**Seniow et al, 2002**). Portala et al **(2001)** realizaram estudo para caracterizar o perfil de desempenho neuropsicológico em pacientes com DW. Os resultados evidenciaram que os pacientes com DW sintomáticos apresentavam desempenho significativamente inferior aos dos pacientes assintomáticos em vários domínios cognitivos: memória de curto prazo, atenção, gramática, velocidade de decodificação de palavras. Os autores observaram ainda que o índice de erros impulsivos foi nitidamente maior nos pacientes sintomáticos e que a descrição de demência em pacientes com DW é rara.

Existe um amplo espectro de apresentação psiquiátrica na DW. Distúrbios psíquicos, desde leves alterações do humor, ansiedade e até quadros psicóticos, são comuns. Em cerca de 20% dos pacientes com DW a manifestação inicial é psiquiátrica (**Denning et al, 1989a; Youssef, 2003**). Assim como para o quadro neurológico, a literatura é extensa quanto a revisões sobre manifestações psiquiátricas na DW

(Hoogenraad, 1986; Lewitt et al, 2002; Brewer, 2001; Pfeiffer, 2004). A casuística mais importante e extensa acerca do tema é descrita por Denning et al (1989b).

A presença do anel de K-F é sugestiva de DW. Trata-se de sinal de grande valor diagnóstico, embora possa estar ausente em casos com manifestações exclusivamente hepáticas. A catarata em girassol, conseqüente ao depósito de cobre no cristalino, é mais rara, porém mais específica que o anel de K-F (Deguti et al, 2002).

Das manifestações osteoarticulares, geralmente relacionadas à lesão tubular renal com perdas de cálcio e fósforo, a mais comum é a osteoporose, que pode determinar fraturas espontâneas. Outros tipos de acometimento osteoarticular são: osteomalácia, osteoartrite e osteocondrite dissecante. No quadro das alterações renais observamos mais freqüentemente aminoacidúria (alteração encontrada com alta frequência na DW) e nefrocalcinose (Ala et al, 2005). Entre as manifestações hematológicas estão o hiperesplenismo relacionado à hipertensão portal e a anemia hemolítica, decorrente de altos níveis de cobre sérico livre. Lesões dermatológicas podem estar presentes, sob a forma de hiperpigmentação, nos membros inferiores, lúnula azulada e acantose nigricans (Pfeiffer, 2004). Manifestações decorrentes de comprometimento cardíaco são raras, mas podem ser graves (Azevedo et al, 1978).

2.5 Diagnóstico

O diagnóstico de DW tem base no quadro clínico e na dosagem do cobre urinário, da ceruloplasmina e do cobre séricos. Em pacientes com quadro neurológico instalado o diagnóstico é facilitado pela presença do anel de K-F. Dificuldades maiores

podem apresentar-se em pacientes com quadro inaugurado por manifestações sistêmicas, ou no rastreamento de familiares de pacientes com diagnóstico conhecido, pois a faixa de variação dos níveis de ceruloplasmina, cobre sérico e urinário apresentam algum grau de sobreposição entre normais, heterozigotos e afetados. Para casos duvidosos, o exame mais seguro é a avaliação do teor de cobre no tecido hepático. Os testes com cobre radioativo oferecem grandes dificuldades técnicas para sua execução e, por essa razão, são pouco utilizados. O teste genético só é aplicável a familiares de pacientes com DW diagnosticada, porém tem como vantagem sobre os demais permitir o diagnóstico logo no primeiro ano de vida.

As imagens de RNM mostram alterações com predileção para os núcleos da base em, virtualmente, todos os casos com manifestações neurológicas. Essas anormalidades, principalmente as alterações de sinal no putâmen, embora não sejam específicas da DW, podem ser altamente sugestivas da moléstia e úteis para confirmação do diagnóstico, assim como para controle evolutivo, pois regredem, pelo menos em parte, com o tratamento (Magalhães et al, 1994).

2.6 Tratamento

Em pacientes com DW, mas assintomáticos, o tratamento deve ser iniciado e mantido com sais de zinco. A penicilamina e o trientine são indicados em pacientes sintomáticos, por serem mais potentes e com início de ação mais rápido, porém existem controvérsias quanto ao uso dos quelantes de cobre, principalmente a penicilamina, face ao risco potencial de piora do quadro neurológico no início do

tratamento e eventuais efeitos colaterais da droga. Aguarda-se a liberação para uso comercial do tetratiomolibdato, que poderá suplantará os outros quelantes no tratamento dos pacientes sintomáticos (**Brewer et al, 2006**). O transplante hepático se reserva aos pacientes com insuficiência hepática grave.

3. OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo foram:

- 1- Descrever e analisar as manifestações neurológicas em uma amostra expressiva de pacientes com DW, destacando manifestações neurológicas atípicas. Descrever ainda as manifestações psiquiátricas e o grau de incapacidade motora nesta amostra de pacientes. **(I II e III)**
- 2- Descrever o genótipo *ATP7B* em parte desta amostra de pacientes com doença de Wilson e manifestações neurológicas. **(IV)**
- 3- Avaliar possíveis correlações entre o genótipo *ATP7B* e as manifestações neurológicas. **(IV)**

4. MÉTODOS

4.1 Manifestações neurológicas (I, II e III)

O estudo das manifestações neurológicas foi retrospectivo em 109 pacientes, avaliados no período de 1963 a 2001, através da revisão de prontuários médicos do HC/FMUSP e do banco de dados do Grupo de Estudos de Distúrbios do Movimento da Divisão de Clínica Neurológica do HC/FMUSP. Foram incluídos todos os casos em que havia informação detalhada e graduada sobre o quadro neurológico, antes do início do tratamento, conforme a escala de avaliação adotada tradicionalmente na Instituição (**Barbosa et al, 1991**).

De 2002 a 2004, foram incluídos 10 novos pacientes com DW e manifestações neurológicas, totalizando 119 casos. As informações foram obtidas sempre por médico neurologista da Instituição, por meio de entrevista e exame neurológico completo. Os critérios adotados para o diagnóstico da DW foram os propostos por **Scheinberg et al (1984)**, subsidiados no quadro clínico, na presença do anel de K-F e nas dosagens urinária de cobre e séricas de ceruloplasmina, e de cobre. Esses critérios são similares aos propostos recentemente por **Brewer (2001)**.

Registraram-se os dados referentes ao gênero, idade no início das manifestações, principal órgão afetado no início do quadro clínico, idade no momento do diagnóstico, sinais e sintomas neurológicos antes do início do tratamento, presença do anel de K-F, presença e tipo de manifestações psiquiátricas e grau de incapacidade funcional. O gênero foi definido em masculino ou feminino. A

avaliação sistematizada do quadro neurológico dos pacientes (**Barbosa et al, 1991**) engloba as manifestações mais comuns observadas na DW. Nesta escala os itens incluídos foram: 1) bradicinesia; 2) rigidez; 3) instabilidade postural; 4) distonia; 5) coreia; 6) atetose; 7) tremor (de ação e/ou repouso); 8) distúrbio cerebelar; 9) disartria; 10) disfagia; 11) distúrbios da marcha; 12) *risus sardonicus* 13) outras manifestações neurológicas. Essas manifestações foram graduadas, conforme a intensidade, em zero (ausente), um (leve), dois (moderada) e três (grave). Prejuízos nas atividades de vida diária são indicados em escala de incapacidade motora quantificada de zero a três (Tabela 1). Distúrbios psíquicos também foram registrados e agrupados, conforme a presença de alteração do comportamento, alteração do humor ou descrição mais específica (Tabela 4).

Tabela 1: Protocolo de avaliação da Clínica Neurológica (HC/FMUSP)

Manifestações neurológicas

Bradicinesia

Rigidez

Instabilidade postural

Distonia

Coréia

Atetose

Tremor (de ação e/ou repouso)

Distúrbio cerebelar (ataxia, disdiadococinesia)

Disartria

Disfagia

Distúrbio da marcha

Risus sardonicus

Outras manifestações (sinais piramidais, convulsões,...)

Intensidade da manifestação neurológica

0 Ausente

1 Leve

2 Moderada

3 Grave

Presença de distúrbios psiquiátricos**Presença de anel de Kayser-Fleischer****Incapacidade motora**

0 Desempenho motor normal

1 Discreta dificuldade nas atividades diárias; independente.

2 Dificuldade moderada nas atividades diárias, dependente para várias atividades.

3 Incapacidade motora severa e dependência para todas as atividades.

4.2 Genótipo (IV)

Precedido do termo de consentimento esclarecido, foi colhido o sangue venoso total (10 ml) em tubo com EDTA e extraído o DNA genômico usando-se a técnica de sais. As amostras foram encaminhadas para a Medizinische Klinik em Berlim, Alemanha. Os 21 exons do gene da DW foram amplificados por PCR (Polymerase Chain Reaction) no termociclador Biometra T3 (Biômetra, Göttingen, Alemanha). Realizou-se o sequenciamento direto dos 21 éxons e bordas intrônicas do gene *ATP7B* no analisador automático ABI 310 da Applied Biosystems (**Deguti et al, 2004**).

As mutações indentificadas foram descritas e nomeadas de acordo com as recomendações da literatura (**Antonarakis, 1998**). A sequência original do gene *ATP7B* foi obtida dos bancos de dados EMBL (www.ensembl.org) e NIH (www.ncbi.nlm.nih.gov). A descrição do genótipo compreendeu 27 pacientes apresentados em estudo anterior (**Deguti, 2004**) e 14 novos, totalizando 41 pacientes com DW e manifestações neurológicas.

4.3 Análise estatística (I e IV)

Para as variáveis idade no início das manifestações, idade no diagnóstico da DW e intervalo de tempo até o diagnóstico, esta análise foi feita pela observação de valores mínimos e máximos e cálculo da média e desvio-padrão. Na caracterização do quadro neurológico avaliou-se a frequência de cada manifestação. O programa Minitab (Minitab, Inc. State College, PA), versão 14, foi usado nesta avaliação.

Para correlacionar a idade de início do quadro clínico com a frequência das manifestações neurológicas, utilizou-se o coeficiente de correlação linear de Pearson (CP) (Neter et al, 1996). O programa Excel/Office, versão 2003, serviu à avaliação.

Para saber se o genótipo estava associado ao quadro neurológico, foram feitos testes qui-quadrado de homogeneidade (Agresti, 1990) entre três grupos de genótipos, de acordo com a presença da mutação mais comum (p.A1135fs): G1) p.A1135fs ++ (homozigotos); G2) p.A1135fs +/- (heterozigotos); G3) p.A1135fs -/- (outras mutações), em relação às manifestações neurológicas e também ao sexo do paciente. Foi realizada análise de variâncias (Neter et al, 1996) para verificar se a idade do primeiro sintoma neurológico variava entre os três grupos de genótipos estudados. Os testes foram realizados ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$). O programa SPSS (The Statistical Package for the Social Sciences), versão 13.0, serviu a essa análise.

5. RESULTADOS

5.1 Manifestações neurológicas (I)

Foram incluídos no presente estudo um total de 119 pacientes que preenchiam os critérios diagnósticos de DW e apresentavam manifestações neurológicas e que foram avaliados no Ambulatório de Distúrbios do Movimento da Divisão de Clínica Neurológica do HC/FMUSP no período de 1963 a 2004. Os dados de identificação dos pacientes estão discriminados no anexo 8.3. Quarenta e oito eram do sexo feminino e 71 do sexo masculino.

A idade de início dos sintomas neurológicos variou de 7 a 37 anos (19,6 +/- 6 anos), enquanto a média de idade no diagnóstico da DW foi de 20,7 +/- 6,7 anos (7-39 anos). O tempo médio do início dos sintomas ao diagnóstico foi, portanto, de 1,1 +/- 1,2 anos (0-5 anos).

As frequências das principais manifestações neurológicas dos pacientes estão descritas na tabela 2. Entre os 119 pacientes estudados, em 97 (82,3%) o quadro neurológico foi à primeira manifestação. Em 65 (54%) foram descritas manifestações psiquiátricas associadas ao quadro neurológico (Tabela 4). Em 19 (16%) a primeira manifestação foi a hepática e em dois pacientes (1,7%) a primeira manifestação foi o acometimento articular. Todos os casos apresentavam anel de K-F.

Tabela 2: Manifestações neurológicas em 119 pacientes

Manifestações neurológicas	Número de pacientes	%
Disartria	109	91
Distúrbios da marcha	89	75
Distonia	82	69
<i>Risus sardonicus</i>	86	72
Bradicinesia	68	58
Rigidez	78	66
Instabilidade postural	54	49
Tremor de repouso	6	5
Tremor postural	65	55
Distúrbio cerebelar	33	28
Disfagia	59	50
Coréia	19	16
Atetose	17	14

Na análise de correlação dos dados clínicos observamos uma relação linear entre idade de início do quadro neurológico e presença de tremor (CP = 0,92) e ataxia (CP = 0,99), mais frequentes na terceira década de vida. Por outro lado, observamos uma correlação linear inversa entre as manifestações distonia (CP = -0,87), parkinsonismo (CP = - 0,83) e *risus sardonicus* (CP = - 0,94) e a idade de início das manifestações neurológicas. Essas últimas manifestações foram mais prevalentes na faixa etária dos 11 aos 15 anos de idade.

Manifestações neurológicas atípicas, encontradas em 16 pacientes (13%): convulsões, sinais piramidais, incontinência urinária, estereotipia e mioclonia (Tabela 3). Incapacidade motora com prejuízo nas atividades diárias da vida se

constatou em 105 pacientes (88%). Em 22 (18%) se verificou dificuldade motora leve, em outros 53 (45%) dificuldade na maioria das atividades, requerendo ajuda constante. E em 30 pacientes (25%), o comprometimento motor era grave com dependência total em todas as atividades.

Tabela 3: Manifestações neurológicas atípicas

Paciente	Idade	Manifestações neurológicas
15	15	Convulsões
18	14	Convulsões e hiperreflexia
22	13	Hiperreflexia e sinal de Babinski bilateral
30	13	Hiperreflexia
36	34	Convulsões
37	23	Hiperreflexia
49	18	Convulsões
54	13	Hiperreflexia
56	28	Hiperreflexia
64	27	Hiperreflexia, sinal de Babinski e incontinência urinária
68	18	Hiperreflexia e sinal de Babinski bilateral
86	23	Estereotipia
91	20	Mioclonia
99	19	Convulsões
107	35	Incontinência urinária
112	18	Hiperreflexia

As descrições dos prontuários indicavam déficits cognitivos leves na maioria dos pacientes. Porém testes neuropsicológicos não foram aplicados. Distúrbio cognitivo grave com quadro demencial evidente ficou bem caracterizado em cinco pacientes (4,2%).

Tabela 4: Manifestações psiquiátricas

Manifestações psiquiátricas	Número de pacientes	%
Depressão	16	13
Alteração do comportamento (desinibição, irritabilidade, apatia,...)	38	31
Labilidade emocional	9	8
Distúrbio bipolar	1	1
Ansiedade generalizada	1	1
Total	65	54

5.2 Genótipo (IV)

Foram descritos os genótipos em 41 pacientes com manifestações neurológicas na DW. O grupo constituiu-se de 39 casos-índice e dois familiares. Constatou-se consangüinidade no histórico familiar em 13 casos não relacionados (33%). Em um paciente não foram encontradas mutações nos dois alelos e em quatro pacientes foi encontrada mutação somente em um alelo. A mutação mais comum foi a p.A1135fs, presente em 21 pacientes (frequência alélica de 32,9%), sendo seis homozigotos e 15 heterozigotos. A mutação p.L708P foi identificada em nove pacientes (frequência alélica de 15,8%), quatro homozigotos e cinco heterozigotos.

Três pacientes (frequência alélica de 6%), dois homozigotos e um heterozigoto, apresentavam a mutação p.H1069Q. Dois pacientes (primos) apresentavam a mutação intrônica IVS3+1G>C (frequência alélica de 5%). As outras mutações ocorreram com frequência menor do que 5% (Tabela 5).

As mutações p.L813Yfs, p.S932X, p.V949G, p.L1088X, p. F1094L, p.T1232P, p.L1373R e IVS3+1G>C foram descritas pela primeira vez no estudo de Deguti et al (2004). As novas mutações não foram encontradas no grupo controle, composto por 60 voluntários não portadores de DW, sugerindo que não são polimorfismos comuns.

Quando agrupamos os pacientes conforme a presença da mutação p.A1135fs (Tabela 6), observamos diferentes frequências de manifestações neurológicas, sendo que a manifestação disfagia apresenta diferença expressiva ($p < 0,05$) entre os três grupos. Manifestações distônicas, parkinsonianas e coréicas foram mais frequentes no grupo de pacientes homozigotos para mutação p.A1135fs (G1), que também era o grupo mais jovem. Pacientes com manifestações neurológicas atípicas foram mais prevalentes nos dois primeiros grupos (G1: 2(33%); G2: 2(13%); e G3: 1(5%); $p = 0.175$). O paciente com mioclonias carregava o genótipo p.A1135fs / p.A1135fs. Os dois pacientes com quadro de incontinência urinária apresentavam os genótipos p.A1135fs / p.A1135fs e p.K1238Sfs / p.K1238Sfs. Outro com história de convulsões tinha o genótipo p.A1135fs / p.R1319X.

Tabela 5: Mutações encontradas e manifestações neurológicas em 41 pacientes

Caso	DNA 1	Proteína 1	DNA 2	Proteína 2	Idade de início	Manifestações neurológicas principais
17	#	#	#	#	16	alteração da marcha, disartria e tremor postural graves; ataxia, disartria, distonia e disfagia moderadas
82	c.2304_2305insC	p.M769fs	#	#	19	Bradicinesia, distonia e disartria leves, ataxia moderada
89	c.2304_2305insC	p.M769fs	c.2846T>G	p.V949G	27	tremor postural grave; disartria, ataxia moderadas e alteração da marcha leve
48	c.3402delC	p.A1135fs	#	#	14	disartria grave; rigidez e distonia moderadas e bradicinesia e alteração da marcha leves
54	c.3402delC	p.A1135fs	#	#	11	disartria, parkinsonismo, tremor postural e disfagia leves
80	c.3402delC	p.A1135fs	#	#	11	disartria, alteração da marcha, bradicinesia e distonia moderadas e rigidez leve
108	c.1436delC	p.P479Hfs	c.3402delC	p.A1135fs	24	disartria moderada
94	c.3402delC	p.A1135fs	c.2438_2440delTAAinsAT	p.L813Yfs	9	disartria, alteração da marcha e distonia leves
73	c.3402delC	p.A1135fs	c.3402delC	p.A1135fs	14	mioclonias; disartria grave; distonia, coreia e rigidez moderadas; bradicinesia e disfagia leves
69	c.3402delC	p.A1135fs	c.3402delC	p.A1135fs	15	disartria e coreia moderadas; distonia, tremor postural e bradicinesia leves
90	c.3402delC	p.A1135fs	c.3402delC	p.A1135fs	18	disartria e bradicinesia graves; rigidez, distonia e alteração da marcha moderadas; tremor postural e disfagia leves
99	c.3402delC	p.A1135fs	c.3402delC	p.A1135fs	18	disartria, ataxia, tremor postural, bradicinesia e rigidez moderadas; disfagia e alteração da marcha leves
103	c.3402delC	p.A1135fs	c.3402delC	p.A1135fs	19	incontinência urinária; distonia e disartria graves; alteração da marcha moderada e rigidez e coreia leves
100	c.3402delC	p.A1135fs	c.3402delC	p.A1135fs	14	rigidez e bradicinesia moderadas; diartria, disfagia e distonia leves

Continua...

Continuação Tabela 5

Caso	DNA 1	Proteína 1	DNA 2	Proteína 2	Idade de início	Manifestações neurológicas principais
100	c.3402delC	p.A1135fs	c.3713_14delAA	p.K1238Sfs	19	distonia, tremor postural, disartria e ataxia leves
105	c.3402delC	p.A1135fs	IVS13-13 G>C	#	18	disartria grave; alteração da marcha, rigidez e bradicinesia moderadas
93	c.3402delC	p.A1135fs	c.3263T>A	p.L1088X	16	disartria, rigidez, bradicinesia e alteração da marcha moderadas
89	c.3402delC	p.A1135fs	c.2123T>C	p.L708P	14	tremor postural, ataxia e disartria leves
33	c.2123T>C	p.L708P	c.3402delC	p.A1135fs	13	disartria grave; distonia, rigidez, bradicinesia, tremor postural e disfagia moderadas; alteração da marcha leve
32	c.3402delC	p.A1135fs	c.2123T>C	p.L708P	9	disartria, distonia e coreia graves; disfagia e atetose moderadas e rigidez leve
101	c.3402delC	p.A1135fs	c.3818C>T	p.P1273L	34	disartria grave; disfagia e bradicinesia moderadas; rigidez, tremor de repouso e distonia leves
92	c.3402delC	p.A1135fs	c.3121C>T	p.R1041W	30	tremor postural grave; ataxia e disartria moderadas
99	c.3955C>T	p.R1319X	c.3402delC	p.A1135fs	16	convulsões; disartria e tremor postural leves
107	c.3713_14delAA	p.K1238Sfs	c.3713_14delAA	p.K1238Sfs	24	incontinência urinária; disartria, disfagia, alteração da marcha e rigidez moderadas; tremor postural e bradicinesia leves
52	c.2293G>A	p.D765N	c.2293G>A	p.D765N	26	tremor postural e alteração da marcha graves; disartria e distonia leves
77	c.3282C>G	p.F1094L	c.3282C>G	p.F1094L	25	disartria, alteração da marcha, distonia graves; rigidez e bradicinesia moderadas e disfagia leve
8	c.3207C>A	p.H1069Q	c.3207C>A	p.H1069Q	25	disartria e tremor postural graves, ataxia moderada e rigidez leve
105	IVS3+1G>C	#	IVS3+1G>C	#	14	disartria e disfagia leves
95	IVS3+1G>C	#	IVS3+1G>C	#	16	disartria moderada; alteração da marcha, disfagia, distonia e bradicinesia leves

Continua...

Conclusão Tabela 5

Caso	DNA 1	Proteína 1	DNA 2	Proteína 2	Idade de início	Manifestações neurológicas principais
86	c.4118T>G	p.L1373R	c.3207C>A	p.H1069Q	21	disartria, tremor postural, coréia e distonia moderadas
106	c.2123T>C	p.L708P	c.2123T>C	p.L708P	14	disartria, tremor postural e bradicinesia leves
51	c.2123T>C	p.L708P	c.2123T>C	p.L708P	20	disartria grave; bradicinesia, rigidez, tremor de repouso e alteração da marcha moderadas e distonia e disfagia leves
104	c.2123T>C	p.L708P	c.2123T>C	p.L708P	28	disartria e disfagia graves; alteração da marcha e tremor postural moderados; rigidez, bradicinesia e ataxia leves
58	c.2123T>C	p.L708P	c.1934T>G	p.M645R	23	disartria e disfagia graves; distonia moderada; alteração da marcha, bradicinesia e ataxia leves
39	c.2123T>C	p.L708P	c.2795C>A	p.S932X	20	disartria, disfagia, alteração da marcha tremor postural e distonia leves
71	c.3955C>T	p.R1319X	IVS 14-12T>A	#	16	disartria e coréia moderadas; distonia, tremor postural e alteração da marcha leves
87	c.3818C>T	p.P1273L	c.2795C>A	p.S932X	21	disartria e alteração da marcha moderadas; rigidez, bradicinesia, distonia, coréia e tremor postural leves
85	c.3182G>A	p.G1061E	c.3694A>C	p.T1232P	13	disartria moderada; rigidez, ataxia, disfagia e alteração da marcha leves
112	c.3207C>A	p.H1069Q	c.3207C>A	p.H1069Q	16	disartria grave; rigidez, bradicinesia e alteração da marcha moderadas
102	c.2123T>C	p.L708P	c.2123T>C	p.L708P	18	disartria e bradicinesia graves; rigidez e alteração da marcha moderadas e distonia leve
20	c.3402delC	p.A1135fs	c.3818C>T	p.P1273L	19	disartria e tremor graves

: não encontrado mutações

Tabela 6: Dados demográficos e manifestações neurológicas conforme o genótipo

Grupos	Grupo 1: homozigotos p.A1135fs (n=6)	Grupo 2: heterozigotos p.A1135fs (n=15)	Grupo 3: outras mutações (n=20)	Significância (p)
Sexo (F\M)	2\4	6\9	8\12	0,953
Etnia (brancos\negros\mulatos)	5\0\1	12\1\2	16\3\1	
Forma de apresentação clínica inicial (hepática \neurológica\psiquiátrica)	3\1\2	3\12\0	5\11\4	
Idade de início das manifestações neurológicas	16,3 (+/- 2,25)	17,1 (+/- 7,33)	20,1 (+/- 4,68)	0,195
manifestação	pacientes (%)	pacientes (%)	pacientes (%)	P
bradicinesia	5(83%)	7(47%)	11(55%)	0,307
rigidez	5(83%)	8(53%)	9(45%)	0,256
instabilidade postural	4(66%)	9(60%)	8(40%)	0,36
distonia	5(83%)	8(53%)	12(60%)	0,441
coréia	3(50%)	1(7%)	3(15%)	0,055
tremor postural	3(50%)	7(47%)	11(55%)	0,886
manifestação cerebelar	1(17%)	3(20%)	7(35%)	0,814
disartria	6(100%)	15(100%)	20(100%)	#
disfagia	6(100%)	4(27%)	10(50%)	0,01
distúrbio da marcha	4(66%)	9(60%)	15(75%)	0,638
<i>risus sardonicus</i>	6(100%)	13(87%)	16(80%)	0,47
manifestações atípicas	2(33%)	2(13%)	1(5%)	0,175

6. DISCUSSÃO

6.1 Manifestações neurológicas (I, II e III)

A média de idade no início do quadro neurológico da casuística apresentada, 19 anos, equipara-se à descrita na literatura (Strickland et al, 1975; Rubinstein et al, 1987; Stremmel et al, 1991; Oder et al, 1991; Bono et al, 2002; Lewitt et al, 2002). A maioria dos pacientes (54%) situava-se na faixa etária dos 11 aos 20 anos (Gráfico 1). Embora o quadro clínico geralmente se delineie na segunda ou na terceira década de vida, há na literatura casos com manifestações neurológicas antes dos 10 anos de idade (Strickland et al, 1975). No outro extremo, relata-se o início do quadro neurológico aos 72 anos (Ala et al, 2005). Discreta predominância do sexo masculino foi observada.

Gráfico 1: Número de pacientes conforme idade de início das manifestações neurológicas e sexo

Ao longo das últimas cinco décadas ficou evidente a tendência de redução do intervalo de tempo entre o início da sintomatologia e o diagnóstico da DW (Tabela 7). A experiência acumulada de vários anos de acompanhamento de pacientes no HC/FMUSP, e o avanço no conhecimento e divulgação de conhecimentos médicos, provavelmente permitiram um diagnóstico mais precoce da forma neurológica da DW.

Tabela 7: Tempo médio entre o início das manifestações neurológicas e o diagnóstico definitivo nas últimas cinco décadas

Décadas	Tempo (em meses)
1963-1969	22
1970-1979	17
1980-1989	13
1990-1999	10
2000-2004	8

As manifestações neurológicas predominantes foram disartria, distonia, tremor, parkinsonismo e alterações da marcha. A maioria dos casos apresentava diversas manifestações associadas. A frequência das manifestações neurológicas em nossa casuística é similar à de outros estudos (Tabela 8).

Tabela 8: Estudos sobre manifestações neurológicas na doença de Wilson

Autores	Ano	número de pacientes com quadro neurológico	disartria (%)	distonia (%)	distúrbio da marcha (%)	tremor (%)	rigidez e bradicinesia (%)	ataxia (%)	coréia e atetose (%)
Homburger et al	1946	4	25	25	*	100	50	50	25
Herz et al	1950	7	57	14	43	100	14	14	14
Bickel et al	1957	12	40	*	40	75	40	*	*
Okinaka et al	1961	34	85	*	*	83	75	*	30
Strickland et al	1975	28	93	82	89	93	86	*	43
Rubinstein et al	1987	31	97	65	42	32	52	58	10
Hoogenraad et al	1987	12	60	10	*	40	30	17	*
Oder et al	1991	27	49	11	18	31	38	51	0
Stremmel et al	1991	31	51	*	31	47	*	*	*
Bono et al	2002	31	76	81	*	76	81	*	*
Narata et al	2002	25	*	28	*	60	50	50	*

*: não referido

Na série apresentada a manifestação neurológica mais comum foi disartria, observada em 109 pacientes (91%). Este sintoma também foi o mais freqüente nos relatos de **Okinaka et al (1961)**, **Strickland et al (1975)**, **Rubinstein et al (1987)**; **Stremmel et al (1991)** e **Oder et al (1991)**. Disfunção fono-articulatórias são proeminentes na DW (**Rubinstein et al, 1987**; **Lewitt et al, 2002**) e podem ser secundárias à síndrome parkinsoniana, distônica cerebelar ou piramidal, mais comumente devido à combinação destas síndromes, justificando a alta prevalência de disartria. As alterações da fala geralmente estão associadas à síndrome predominante na apresentação clínica (**Hoogenraad, 1996**).

A locomoção pode ser afetada pelas manifestações rígido-acinéticas, distônicas, atáxicas e coréicas. Dificuldade à marcha é com freqüência uma manifestação precoce do quadro neurológico (**Lewitt et al, 2002**). Observamos distúrbios da marcha em 89 pacientes (75%).

A distonia pode se apresentar sob diversas formas, desde manifestação focal como expressões faciais e distonia dos pés, até contrações em segmentos mais extensos levando a posturas anormais e distonias generalizadas. É um dos sinais com pouca resposta ao tratamento (**Denny-Brown, 1964**; **Strickland et al, 1975**; **Svetel et al, 2001**). Quadro distônico estava presente em 82 pacientes (69%), predominando nos pacientes mais jovens e guardando relação inversa com a idade (Gráfico 2).

Gráfico 2: Frequência das principais manifestações neurológicas conforme faixa etária

O riso estereotipado (*risus sardonicus*), considerado um sinal típico da DW, com retração do lábio superior e manutenção da boca entreaberta é decorrente de distonia acometendo os músculos faciais, orais e linguais. Este sinal não é exclusivo da DW, sendo descrito em outras patologias por acometimento dos núcleos da base como atrofia de múltiplos sistemas e hemorragia talâmica (Stremmel et al, 1991; Wennig et al, 2003; Sibon et al, 2004). Nesta casuística, em 86 pacientes (72%) o riso sardônico estava presente. Assim como as manifestações distônicas, esta manifestação predominou nos pacientes mais jovens (Gráfico 2).

Entre os casos com parkinsonismo (74%), os pacientes apresentavam rigidez, bradicinesia e instabilidade postural. Tremor de repouso foi observado somente em seis pacientes. Apenas dois casos apresentavam somente parkinsonismo no quadro clínico inicial, sendo, na maioria, associado à outros distúrbios do movimento. A síndrome parkinsoniana também foi mais freqüente nos mais jovens, apesar de estar presente em todos os grupos etários (Gráfico 2).

Tremor foi observado em 71 pacientes (60%) e quase sempre do tipo postural. Esta manifestação é descrita como a mais freqüente em algumas séries (**Homburger et al, 1946; Bickel et al, 1957; Strickland et al, 1975; Scheinberg et al, 1984; Stremmel et al, 1991**). O tremor costuma iniciar-se em um braço e, eventualmente, tomar todo corpo. Pode variar desde um tremor discreto de repouso, até um tremor grosseiro acometendo membros, tronco e segmento cefálico. O tremor proximal de grande amplitude, melhor observado com a extensão dos braços, é uma das manifestações neurológicas características da DW, referida como “tremor em bater de asas”. Lesões em vias dentato-rubro-talâmicas estão provavelmente envolvidas na gênese deste tipo de tremor (**Hoogenraad, 1996**). A manifestação apresentou correlação direta com a idade, sendo mais freqüente no grupo de pacientes com início das manifestações na terceira década (Gráfico 2).

Disfagia é outra manifestação comum na DW sendo encontrada em 59 pacientes (50%), dos quais 14 apresentavam quadro severo, necessitando alimentação por sonda enteral. Distúrbios cerebelares (outros além de disartria, tremor e distúrbios da marcha) estavam presentes em 33 pacientes (28%), incluindo ataxia apendicular, disdiadococinesia e hipotonia. Assim como o tremor, manifestações cerebelares foram mais frequentes na terceira década de vida (Gráfico 2). Coréia e atetose foram

manifestações pouco frequentes nesta casuística (16 e 14% respectivamente) e, na maioria das séries publicadas, estão ausentes ou presentes em pequena porcentagem dos pacientes (Tabela 8).

Corroborando a literatura, duas formas polares de apresentação neurológica foram evidenciadas (Gráfico 2). A primeira de início mais precoce e predomínio de quadro distônico e parkinsonismo (forma juvenil de Wilson) e a segunda de início mais tardio com predomínio de tremor e ataxia (forma pseudo-esclerótica). Todos os 119 casos apresentavam anel de K-F. Em pacientes com manifestações neurológicas, com raríssimas exceções, o anel está sempre presente (Steindl et al, 1997).

A prevalência de epilepsia na DW é de aproximadamente 6% (Denning et al, 1988) e pode ocorrer em qualquer estágio da doença (Hoogenraad, 1996). Nesta casuística, cinco pacientes (4,2%) apresentaram convulsões. Entre estes, apenas um apresentou convulsões após os 20 anos. Convulsões são descritas geralmente em pacientes com a forma juvenil da DW (Lewitt et al, 2002). Em três pacientes as convulsões ocorreram após o início do tratamento com penicilamina. Em um destes casos (119) o paciente apresentou quadro de estado de mal epilético com crises motoras focais recorrentes e posterior generalização. Na literatura existem poucos relatos desta condição (Denning et al, 1988; Turk-boru et al, 2003).

No caso 86, as manifestações iniciais eram tremor e distonia com movimentos das mãos repetitivos e estereotipados e sem propósito, compatíveis com estereotipias. Este tipo de distúrbio do movimento é raro na DW (Yorio et al, 1997).

Síndrome piramidal típica com reflexos profundos exaltados e sinal de Babinski foi observada em três pacientes com quadro neurológico grave. Envolvimento piramidal é descrito esporadicamente na DW (Hoogenraad, 1996).

O caso 64 apresentava quadro atípico: aos 26 anos, apresentou fraqueza progressiva em membros inferiores simulando quadro medular com liberação piramidal e incontinência urinária. Após alguns meses evoluiu com parkinsonismo e distonia quando o diagnóstico de DW foi confirmado. Não encontramos na literatura quadro semelhante na DW.

Em outro caso (91), a apresentação foi complexa e de difícil diagnóstico com mioclonias generalizadas e quadro psiquiátrico (**II**). Os sintomas se iniciaram aos 16 anos com alterações de comportamento (agressividade) e posteriormente houve evolução com instabilidade da marcha e tremor de membros superiores, sendo que aos 19 anos estava incapaz para todas as atividades, restrito ao leito. Nesta idade iniciou quadro de abalos envolvendo os quatro membros e foi encaminhado para nosso serviço. Ao exame neurológico foi observada distonia generalizada principalmente em dimídio à esquerda, tremor postural e de intenção nos membros superiores, anartria e disfagia severa. Abalos mioclônicos intermitentes, afetando simetricamente os quatro membros e o tronco eram evidentes. O diagnóstico de DW foi confirmado pelos exames laboratoriais e presença do anel de K-F. Mioclonia foi descrita raramente na DW. Em revisão extensa publicada em 1988, **Dening et al** descrevem apenas um caso com mioclonia focal.

Outras manifestações atípicas já descritas na DW e não encontradas nesta casuística, incluem distúrbios da motricidade ocular (**Hoogenraad, 1996**) crises oculógiras (**Lee et al, 1999**), paralisia periódica hipocalêmica, câimbras musculares, alterações sensitivas (**Pfeiffer, 2004**) e discinesia respiratória com tosse associada (**Crone et al, 2005**).

O relato freqüente de prejuízo nas atividades diárias, como dificuldade de concentração em tarefas habituais e queda no rendimento escolar e de trabalho, sugere alterações cognitivas na maioria dos pacientes. Quadro sugestivo de prejuízo cognitivo foi achado comum nesta casuística, mas apenas cinco pacientes (4,2%) evoluíram com quadro evidente de demência.

Manifestações psiquiátricas estavam presentes em 65 (54%) dos pacientes e eram geralmente sintomas leves. Os sintomas psiquiátricos mais freqüentemente observados foram depressão, labilidade emocional, irritabilidade e desinibição. A literatura também mostra estas manifestações como as mais prevalentes (**Dening et al, 1989b; Lewitt et al, 2002; Brewer, 2001; Pfeiffer, 2004**). Dos 119 pacientes, nove (8%) manifestaram quadro grave, que motivou internação em serviço psiquiátrico. Neste subgrupo foram observados catatonia, agitação psicomotora, agressividade, quadro psicótico e mania. Entre estes pacientes, o caso 48 (**III**) apresentou distúrbio bipolar que se iniciou meses antes do quadro neurológico. Não havia história familiar prévia de distúrbio de humor e o quadro remitiu com o tratamento para DW sem necessidade de uso de drogas estabilizantes do humor. Este paciente se mantém assintomático nove anos depois do início do tratamento. Caso similar foi descrito por **Keller et al (1999)**.

A maioria dos pacientes (88%) apresentou na avaliação inicial incapacidade motora com prejuízo nas atividades de vida diária (Tabela 1), indicando a intensidade e severidade do quadro neurológico na DW.

6.2 Genótipo (IV)

Os tipos de mutação e a posição das mesmas no gene *ATP7B* podem, certamente, ter relação direta com o grau de disfunção da proteína *ATP7B*. Isso levaria à disfunção variável no metabolismo do cobre e, por fim, a fenótipos diversos da doença. Estudos recentes têm avaliado o papel do genótipo *ATP7B* na determinação da variabilidade fenotípica na DW. A investigação desta relação tem mostrado restrições metodológicas devido ao número limitado de pacientes, ao grande número de mutações geralmente em heterozigose e a freqüente ausência de padronização na avaliação clínica dos pacientes. Assim, é ainda indeterminada a influência das diversas mutações, descritas em número crescente todos os anos, na variabilidade e intensidade das manifestações clínicas na DW.

No grupo de 41 pacientes em que o genótipo foi estudado, 22 mutações distintas foram encontradas (Tabela 5). A mais freqüente (32,9%) foi a mutação *frameshift* p.A1135fs (alanina na posição 1135 é o primeiro aminoácido alterado), secundária a deleção do nucleotídeo citosina na posição 3402 (c.3402delC) no éxon 15. Esta mutação já foi previamente descrita em norte-americanos caucasianos, suecos (**Waldenstrom et al, 1996**), chegando a corresponder a 19% das mutações entre pacientes russos (**Shah et al, 1997**) e 9% entre alemães (**Caca et al, 2001**). **Vrabelova et al (2005)** estudaram o genótipo de 227 pacientes com DW na população Checa e Eslovaca e encontraram a mutação p.A1135fs como a segunda mais freqüente (3,5%). Entre estes grupos étnicos, somente os alemães entraram em número expressivo no Brasil nos últimos dois séculos (**Deguti, 2004**).

No grupo estudado havia 39 casos-índice e dois familiares. Os irmãos com o genótipo p.L708P/p.L708P (casos 104 e 106) apresentaram quadro neurológico semelhante com parkinsonismo e tremor postural. Porém, em um deles (106), com idade de início aos 14 anos e associado à manifestação hepática, e no outro (104), com início aos 28 anos e associado à depressão. Em outra família, dois primos (casos 105 e 95) com o genótipo IVS3+1G/C / IVS3+1G/C, apresentaram disartria precocemente, porém em um dos casos (95) estava presente também quadro distônico.

A ocorrência de fenótipos variados em pacientes com as mesmas mutações, principalmente entre membros de uma mesma família, é uma evidência de que, além das mutações no gene *ATP7B*, existem outros determinantes do fenótipo (**Deguti et al, 2004; Panagiotakaki et al, 2004; Senzolo et al, 2007**). Alguns estudos avaliaram outros fatores genéticos e epigenéticos, além das mutações no gene *ATP7B*, capazes de influenciar o fenótipo neurológico na DW. A variação genética da apolipoproteína E parece ter influência no início das manifestações neurológicas. Uma publicação recente sugere que o tipo selvagem (apo E 3/3) da apolipoproteína E confere algum grau de proteção contra toxicidade do cobre no sistema nervoso central, levando a manifestações neurológicas e hepáticas mais tardias em pacientes homozigotos para mutação p.H1609Q (**Schiefermeier et al, 2000**).

A influência do gene da proteína priônica nas manifestações neurológicas da DW foi assinalada por **Grubenbecher et al (2006)**. Nesse estudo, os autores analisaram o códon 129 do gene da proteína priônica em 40 pacientes com DW. Adotando escala de avaliação neurológica semelhante à adotada em nosso serviço (**Barbosa et al, 1991; Machado et al, 2006**), os autores compararam o genótipo no

códon 129 com o quadro neurológico e as variáveis demográficas dos pacientes. A conclusão deste estudo foi que o genótipo em homozigose (metionina/metionina) se associava a manifestações neurológicas mais graves, particularmente o tremor.

Outro gene motivo de estudo sobre correlações clínico-genéticas na DW é o *MURRI*, humano homólogo do gene causador da doença autossômica recessiva com acúmulo de cobre em cães Bedlington terriers (Stuehler et al, 2004). Apesar de ter função desconhecida, é claro o papel deste gene no metabolismo do cobre em caninos, e há evidências *in vivo* e *in vitro* da sua interação com a proteína ATP7B nos humanos, fazendo dele um possível regulador do metabolismo do cobre. Stuehler et al (2004), estudaram o genótipo em 63 pacientes com DW e sugerem a associação entre variação de nucleotídeos (D164D) em códon específico do *MURRI* com manifestações neurológicas e/ou hepáticas precoces. Porém, estudo de Lovicu et al (2006) afirma que a mesma variação (D164D) não seria patológica e, analisando 109 genótipos entre casos-controle e pacientes com DW, sugere não haver relação entre este códon e o fenótipo na DW. Fica evidente que as casuísticas desses estudos não permitem conclusões definitivas sobre a relação gene *MURRI* com a DW.

O *splicing* alternativo, com deleção de alguns exons do gene *ATP7B*, leva à produção de isoformas alternativas da proteína ATP7B, e ocorre principalmente no cérebro, mas também no fígado e rins (Thomas et al, 1995). Essas isoformas podem eliminar ou reduzir o efeito de algumas mutações e, assim, certamente influenciar as suas expressões fenotípicas.

O papel dos fatores ambientais no fenótipo da DW é tema menos explorado na literatura. Um possível fator que poderia influenciar o fenótipo da doença seria a dieta. No Brasil, o café e o feijão fazem parte do cardápio diário e, como alimentos

sabidamente ricos em cobre, poderiam interferir no curso da moléstia (**Deguti et al, 2004**). A quantidade de cobre na rede pública de água poderia ser relevante, também na evolução natural e manifestações clínicas da DW (**Panagiotakaki et al, 2004**).

Em um paciente (17) não foram encontradas mutações nos dois alelos. Em outros quatro casos (48, 54, 80 e 82) encontrou-se a mutação somente em um alelo (heterozigotos simples). Nestes pacientes a apresentação neurológica não foi mais branda que nos casos com mutação nos dois cromossomos. Em três casos (48, 54 e 80) com a mutação p.A1135fs em um dos alelos, o quadro clínico iniciou-se precocemente no início da segunda década de vida, com predomínio de distonia e parkinsonismo. O paciente 17 apresentou, aos 16 anos, quadro intenso de tremor associado à ataxia e distonia. O caso 82 apresentou quadro leve, aos 19 anos, de disartria, ataxia e distonia. Uma explicação possível para aparente ausência da mutação seria ela estar situada em partes do gene *ATP7B* não pesquisadas como a região promotora (**Deguti, 2004**). A deleção parcial ou completa do gene *ATP7B* em um alelo também poderia fazer com que não fossem encontradas mutações (**Deguti, 2004**). A outra possibilidade, de nestes casos existir somente uma mutação, contraria o conceito tradicional de que a DW é exclusivamente recessiva (**Marsden, 1987**). Entretanto, alguns autores (**Brewer, 2001**) sugerem a possibilidade de que heterozigotos simples possam desenvolver a doença em situações de ingesta excessiva de cobre ou devido a outros fatores genéticos e epigenéticos.

Conforme explanado na metodologia empregada no presente estudo, com o objetivo de avaliar a presença de correlações entre manifestações neurológicas e as mutações encontradas, os pacientes foram divididos em três grupos, conforme a presença da mutação predominante p.A1135fs.

Considerando cada manifestação neurológica isoladamente, somente a frequência de disfagia foi significativamente maior nos pacientes homozigotos para p.A1135fs ($P < 0,05$). Outra constatação foi que os pacientes homozigotos para p.A1135fs apresentaram, em relação aos outros grupos de genótipos, quadro neurológico mais grave, de início mais precoce, com manifestações distônicas, parkinsonianas e coreicas mais prevalentes, (Tabela 6) e mais frequentemente (50%) apresentaram quadro hepático previamente às manifestações neurológicas. Contudo, com o número reduzido de pacientes com genótipo p.A1135fs/p.A1135fs ($n=6$), estes achados não apresentaram significância estatística.

Corroborando este achado **Thomas et al (1995)** sugerem que mutações indutoras de alterações mais significativas na sequência de leitura do gene (*frameshift*, ou erro de leitura, *nonsense*, ou término de leitura e *splice site mutations*, ou mutações em regiões intrônicas), estão associadas a manifestações clínicas precoces. **Panagiotakaki et al (2004)**, em análise clínico-genética de 93 casos de DW, observam que mutações do tipo *nonsense* e *frameshift* podem levar a doença mais severa (geralmente com manifestações hepáticas) em idade mais precoce. Estes autores salientam que estes tipos de mutações levam à produção de RNAs mensageiros muito instáveis. Em estudo mais recente **Gromadzka et al (2005)**, analisando 142 pacientes, demonstraram a mesma associação, entre mutações mais graves e quadro clínico mais precoce. Outra informação relevante é sobre o papel do éxon 15, onde está situada a mutação *frameshift* p.A1135fs. Ele codifica sequências de aminoácidos responsáveis pela formação da alça de ligação do ATP na ATP7B, região de reconhecida importância na função desta proteína (**Deguti, 2004**).

Próximo a esta posição, no éxon 14, está a mutação p.H1069Q (substituição de histidina na posição 1069 por glutamina), a mais comum em caucasianos europeus, associada em alguns estudos com apresentação de início tardio e quadro neurológico (Stapelbroek et al, 2004). Kitzberger et al (2005) realçam que a substituição (*missense*) p.H1069Q leva a alteração discreta do gene *ATP7B*, com manutenção da estabilidade e formato da proteína ATP7B, levando à quadro clínico mais benigno, de início tardio. No presente estudo, dois pacientes apresentaram o genótipo p.H1069Q/p.H1069Q (casos 8 e 112). No caso oito a doença iniciou-se aos 26 anos com quadro de tremor em membros superiores, ataxia e disartria. Apresentou regressão completa dos sintomas após um ano de tratamento com penicilamina, e mantém-se assintomático desde então, com quatro décadas de seguimento ambulatorial, estando hoje com 66 anos de idade. O caso 112 iniciou o quadro aos 15 anos com manifestações hepáticas (icterícia e colúria) e posteriormente, aos 16 anos, evoluiu com quadro neurológico com rigidez e bradicinesia. Neste segundo caso a resposta ao tratamento também foi favorável, com regressão das manifestações neurológicas em curto período de tratamento. A boa evolução clínica nos dois casos pode ter relação com o genótipo p.H1069Q em homozigose.

Finalmente, o número pequeno de pacientes com o mesmo genótipo impede conclusões definitivas a respeito de correlações clínico-genéticas. Estudos clínicos e genéticos abrangendo maior número de pacientes assim como a pesquisa básica envolvendo a proteína ATP7B são necessários para avançar no conhecimento e nos cuidados dos pacientes com DW.

7. CONCLUSÕES

- 1 - Foram descritas as manifestações neurológicas em uma amostra significativa de pacientes com DW permitindo vislumbrar melhor o perfil clínico desta forma de apresentação da doença no Brasil. Ao longo das últimas quatro décadas observamos uma tendência de redução do intervalo de tempo entre o início do quadro neurológico e o diagnóstico da DW. Entre as manifestações neurológicas mais frequentes, observaram-se: disartria (91%), distúrbios da marcha (75%), *risus sardonicus* (72%), distonia (69%), rigidez (66%), tremor (60%) e disfagia (50%). Assim como na literatura, foi evidente a presença de duas formas distintas de apresentação neurológica (pseudo-esclerótica e forma juvenil de Wilson). Manifestações atípicas, encontradas em 16 pacientes (13%) incluíram convulsões, sinais piramidais, incontinência urinária e mioclonia. Manifestações psiquiátricas estavam presentes em 65 (54%). Incapacidade motora, com prejuízo nas atividades diárias da vida, se constatou em 105 pacientes (88%).
- 2 - O estudo genotípico mostrou a heterogeneidade das mutações em 41 pacientes brasileiros com formas neurológicas da DW. Foram descritas 23 mutações diferentes. A mutação mais comum foi a p.A1135fs, presente em 21 pacientes (frequência alélica de 31,7%). A mutação p.L708P foi identificada em nove pacientes (frequência alélica de 15,8%) e três pacientes apresentavam a mutação p.H1069Q (frequência alélica de 6,09%). As outras mutações ocorreram com frequência menor do que 6%.

-
- 3 - A mutação p.A1135fs estava presente com frequência elevada neste grupo de pacientes. Observou-se uma provável associação da mutação p.A1135fs com o quadro neurológico grave e precoce. O número limitado de pacientes em que foi realizado o estudo das mutações não permitiu conclusões definitivas sobre correlação genótipo-fenótipo na DW.

8. ANEXOS

8.1 Artigos

Movement Disorders
Vol. 21, No. 12, 2006, pp. 2192–2196
© 2006 Movement Disorder Society

Neurological Manifestations in Wilson's Disease: Report of 119 Cases

Alexandre Machado, MD^{1*}, Hsin Fen Chien, MD¹, Marta Mitiko Deguti, MD², Eduardo Cançado, MD²,
Raymundo Soares Azevedo, MD³, Milberto Scaff, MD, PhD,¹ and Egberto Reis Barbosa, MD, PhD¹

¹Department of Neurology, University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, Brazil

²Department of Hepatology and Gastroenterology, University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, Brazil

³Department of Pathology, University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, Brazil

Abstract: We describe the neurological manifestations of 119 patients with WD (93 index cases and 26 affected family members) seen between 1963 and 2004. The mean age at symptoms onset was 19.6 years (range, 7–37 years). Medical records were reviewed for the patient's first neurological examination. The most frequent neurological manifestations observed were dysarthria (91%), gait disturbance (75%), *risus*

sardonicus (72%), dystonia (69%), rigidity (66%), tremor (60%), and dysphagia (50%). Less frequent manifestations were chorea (16%) and athetosis (14%). Rare neurological presentations were seizures (4.2%), and pyramidal signs (3%).
© 2006 Movement Disorder Society

Key words: Wilson's disease; neurological manifestations

Wilson disease (WD), named after S.A.K. Wilson, who first described the disease in 1912,¹ is an autosomal recessive disorder due to a mutation of the ATP7B gene on chromosome 13.^{2,3} This gene encodes a copper-transporting adenosine triphosphatase (ATPase) protein, and copper overload in various tissues results. More than 250 mutations have been identified.⁴ Improving early accurate clinical diagnosis and understanding the genotype/phenotype relationships are two current important goals.

The worldwide prevalence rate of WD is 1:30,000, but it increases in areas where consanguinity is common. The heterozygote carrier rate is 1 case per 90 to 100 persons. Clinically, patients present with psychiatric, neurological, or hepatic symptoms during the second to fourth decades of life. Neurological manifestations are rare before the age of 10, but when present, dystonia is the most common symptom.⁵ Unfortunately, the diagnosis is often missed or delayed. Psychiatric symptoms are common and varied, and may precede neurological mani-

festations.⁶ The Kayser-Fleischer (K-F) ring, secondary to the deposit of copper in Descemet's membrane of the cornea, is an important physical sign found in virtually all cases with neurological signs. Bony, renal, dermatologic, hematological, and ocular manifestations are uncommon. The diagnosis of WD should always be considered in young patients with unexplained movement disorders.

The most important laboratory tests are serum ceruloplasmin and urinary copper levels. In some cases, biopsy is necessary for the measurement of hepatic copper concentration. Neuroimaging, preferably magnetic resonance imaging (MRI), should be performed before treatment in all patients with neurological manifestations of WD. Abnormalities on MRI are found in almost all individuals with WD and neurological dysfunction.^{7,8} The treatment for WD patients includes chelating agents such as penicillamine, trientine, and zinc salts.^{9–11}

During 2 decades (1960–1980), Hospital das Clínicas of the University of São Paulo was the only referral center for WD in Brazil, but even after the settlement of other centers able to manage WD patients, we continued receiving patients from all regions of the country. Therefore, our sample reflects the pattern of the disease in Brazil. We describe here the neurological manifestations in a large series of patients seen at the Division of

*Correspondence to: Dr. Alexandre Machado, R. Francisco Leão 478, ap 24, São Paulo, Brazil. E-mail: alexandre.machado@hcfcm.usp.br

Received 31 October 2005; Revised 16 July 2006; Accepted 16 July 2006

Published online 31 October 2006 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/mds.21170

8.2 Aprovação do projeto pela Comissão de Ética do HC/FMUSP

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 27.10.05, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **463/05**, intitulado: "Manifestações neurológicas da doença de Wilson: estudo clínico e correlações genotípicas" apresentado pelo Departamento de NEUROLOGIA, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX. 2, letra "c")

Pesquisador(a) Responsável: Prof. Dr. Egberto Reis Barbosa

Pesquisador (a) Executante: Dr. Alexandre Aluizio Costa Machado

CAPPesq, 27 de Outubro de 2005.

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

8.3 Lista dos pacientes

Paciente	Sexo	Iniciais	Registro HC
1	M	HP	677597
2	F	VE	701475
3	M	RAS	733560
4	F	RRC	31493
5	M	AML	2131518-K
6	M	JCM	735346
7	F	RN	713469
8	M	ASF	2119494-K
9	F	EOS	2289781-K
10	F	EPS	796299
11	F	MSSP	37294
12	M	PHSP	35765
13	M	EFV	883369
14	M	FPL	944116
15	M	FPS	931463
16	F	MPS	931464
17	F	AMS	2101793-B
18	M	COFJ	2397778-D
19	F	EPS	955587
20	M	ERS	2130772-G
21	M	FUS	980363
22	M	JFAF	959252
23	F	MLRK	980362
24	M	OOL	972779
25	F	VRP	2309994-K
26	M	AJS	2127778-E
27	M	CAO	2148969-D
28	M	CUS	996843
29	M	FCRL	2295759-D
30	M	PARL	2295755-H
31	F	VLS	2222445-C
32	F	MBN	2182891-B
33	F	MLRC	2120626-F
34	F	RSA	1058939
35	M	AFF	1087099
36	F	APP	2106072-A
37	F	EFP	1040412
38	F	HBL	2201362-J
39	M	JIR	2120204-H

Continua...

Continuação Lista dos Pacientes

Paciente	Sexo	Iniciais	Registro HC
40	F	MGFA	1041333
41	F	MOF	1075471
42	F	MPF	1087098
43	M	WP	921260
44	M	CLMR	117209-G
45	F	ERRL	1104831
46	F	RML	2189756-K
47	M	MMG	2034395-B
48	M	RFP	2038433-H
49	F	CMN	2068069-B
50	M	DARC	2061717-D
51	M	JGC	2029421-C
52	F	MIOM	2025309-C
53	M	RVS	2072862-H
54	M	WMN	2064190-G
55	M	AAS	2108718-H
56	M	JSS	2094166-C
57	M	LGS	2069175-E
58	M	OT	2105517-J
59	F	CGD	2220638-E
60	F	HGD	2220637-F
61	M	JLBS	2299882-K
62	M	JMS	2270145-F
63	M	NML	2299772-G
64	M	RMS	2306854-C
65	F	VLPS	2287926-D
66	M	JMS	2356173-G
67	M	LF	2393888-F
68	M	MLS	2353480-J
69	M	WB	2333901-C
70	F	DARL	2483631-B
71	F	DM	2471999-B
72	M	EOC	2499471-E
73	F	MFL	2467241-G
74	F	DMLO	2441888-F
75	M	MACM	2534364-J
76	F	MCR	2528377-K
77	M	IRN	2642241-H
78	M	MS	7016071-G
79	M	LFC	2683919-G

Continua...

Conclusão Lista dos Pacientes

Paciente	Sexo	Iniciais	Registro HC
80	M	LSS	2741263-I
81	F	ROA	2639294-E
82	M	GSM	2820539-J
83	F	LMNT	2812569-H
84	M	LCV	7022246-F
85	M	LMS	2955638-A
86	F	SZ	2869646-C
87	F	SEM	3078182-G
88	M	GDG	3089050-K
89	F	ESF	3085858-B
90	M	AMC	3113623-C
91	F	TSA	3149147-I
92	M	RAGS	3209855-H
93	F	RS	3205152-D
94	M	BMS	6064775-G
95	M	BSF	3258933-I
96	M	RN	3226247-C
97	F	SBS	7035871-A
98	M	WNM	3227756-I
99	M	AO	3233610-A
100	M	JDBP	3268416-D
101	F	LPS	7037829-I
102	M	ALOS	3353355-J
103	M	DMO	3319327-K
104	M	JOJ	3501332-A
105	M	HBS	3328234-C
106	F	EGS	3335272-B
107	M	DMO	3367595-H
108	F	VCS	3563111-C
109	M	WFP	3342216-C
110	M	EGS	3367670-D
111	F	JCB	13580474-F
112	F	NMCM	13446935-I
113	M	VCP	77062659-D
114	F	CTA	13598955-K
115	M	FBN	13597708-C
116	F	IFCN	2722561-F
117	M	JLBB	13590998-C
118	M	MAJ	13591810-A
119	M	MS	13652428-G

9. REFERÊNCIAS

1. Agresti A. *Categorical Data Analysis*. New York: John Wiley; 1990. p.558.
2. Ala A, Borjigin J, Rochwarger A, Schilsky M. Wilson disease in septuagenarian siblings: raising the bar for diagnosis. *Hepatology*. 2005;41:668-70.
3. Antonarakis SE, Nomenclature Working Group. Recommendations for a nomenclature system for human gene mutations. *Hum Mutat*. 1998;11:1-3.
4. Azevedo EM, Scaff M, Barbosa ER, Gouveia Neto AE, Canelas HM. Heart involvement in hepatolenticular degeneration. *Acta Neurol Scand*. 1978;58:296.
5. Barbosa ER, Scaff M, Comerlatti LR, Canelas HM. DEGENERAÇÃO HEPATOLENTICULAR. Avaliação crítica dos critérios diagnósticos em 95 casos. *Arq Neuropsiquiatr*. 1985;43:234-41.
6. Barbosa ER, Scaff M, Canelas HM. Degeneração Hepatolenticular – Avaliação da Evolução Neurológica em 76 casos tratados. *Arq Neuropsiquiatr*. 1991;49:399-404.
7. Barbosa ER. Horácio Martins Canelas e a história da doença de Wilson no Brasil. In: Reimão R (org.). *História da Neurologia no Brasil*. São Paulo: Lemos-Editorial; 1999. p.75-83.
8. Bertrand E, Lewandowska E, Szpak GM, Hoogenraad T, Blaauwbers HG, Czlonkowska A, Dymecki J. Neuropathologic al analysis of pathological forms of astroglia in Wilson´s disease. *Folia Neuropathol*. 2001;39:73-9.

9. Bickel H, Neale FC, Hall G. A clinical and biochemical study of hepatolenticular degeneration (Wilson's disease). *Quart J Med.* 1957;26:527-58.
10. Bono W, Moutie O, Benomar A, Aidi S, El Alaoui-Faris M, Yahyaoui M, Chikli. La maladie de Wilson. Étude clinique, thérapeutique et évolutive de 21 cas. *Rev Méd Interne.* 2002;23:419-31.
11. Borjigin J, Payne AS, Deng J, Li X, Wang MM, Ovodenko B, Gitlin J. A novel pineal night specific ATPase encoded by the Wilson disease gene. *J Neurosci.* 1999;19:1018-26.
12. Brewer GJ. *WILSON'S DISEASE: A Clinician's Guide to Recognition, Diagnosis, and Management.* Norwell: Kluwer Academic Publishers; 2001.
13. Brewer GJ, Askari F, Lorincz MT, Carlson M, Schilsky M, Kluin KJ, Hedera P, Moretti P, Fink JK, Takanow R, Dick RB, Sitterly J. Treatment of Wilson Disease With Ammonium Tetrathiomolybdate. Comparison of Tetrathiomolybdate and Trientine in a Double-blind Study of Treatment of the Neurologic Presentation of Wilson Disease. *Arch Neurol.* 2006;63:521-7.
14. Bruehlmeier M, Leenders KL, Vontobel P, Calonder C, Antonini A, Weindl A. Increased Cerebral Iron Uptake in Wilson's Disease: A ⁵²Fe-Citrate PET Study. *J Nucl Méd.* 2000;41:781-7.
15. Bull PC, Thomas GR, Rommens JM, Forbes JR, Cox DW. The Wilson disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the Menkes gene. *Nat Genet.* 1993;5:327-37.
16. Caca K, Ferenci P, Kühn H.-J, Polli C, Willgerodt H, Kunath B, Hermann W, Mossner J, Berr F. High prevalence of the H1069Q mutation in East German patients with Wilson disease: rapid detection of mutations by limited sequencing and phenotype-genotype analysis. *J Hepatol.* 2001;35:575-81.

17. Crone NE, Jinnah HA, Reich SG. Wilson's disease presenting with an unusual cough. *Mov Disord.* 2005;20:891-93.
18. Czlonkowska A, Tarnacka B, Litwin T, Gadjia J, Rodo M. Wilson's disease - cause of mortality in 164 patients during 1992-2003 observation period. *J Neurol.* 2005;252:698-703.
19. Czlonkowska A, Tarnacka B, Moller JC, Leinweber B, Bandmann O, Woimant F, Oertel WH. Unified Wilson's Disease Rating Scale - a proposal for the neurological scoring of Wilson's disease patients. *Neurol Neurochir Pol.* 2007;41:1-5.
20. Das SK, Kunal R. Wilson's disease: an update. *Nat Clin Pract Neurol.* 2006;2:482-93.
21. Deguti MM, Tietge UJ, Barbosa ER, Cançado EL. Sunflower cataract and Kayser-Fleischer rings in Wilson's disease. *J Hepatol.* 2002;37:700.
22. Deguti MM. *Doença de Wilson: aspectos demográficos e fenotípicos relacionados ao genótipo ATP7B e estudo do haplótipo em portadores da mutação L708P* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2004.
23. Deguti MM, Genschel J, Cançado EL, Barbosa ER, Bochow B, Mucenic M, Porta G, Lochs H, Carrilho FJ, Schmidt HHJ. Wilson disease: novel mutations in the ATP7B gene and clinical correlation in Brazilian patients. *Hum Mutat.* 2004;23:398-406.
24. Denning TR, Berrios GE, Walshe JM. Wilson's disease and epilepsy. *Brain.* 1988;111:1139-55.
25. Denning TR, Berrios GE. Wilson's disease: clinical groups in 400 cases. *Acta Neurol Scand.* 1989a;80:527-34.

-
26. Denning TR, Berrios GE. Wilson's Disease. Psychiatric Symptoms in 195 Cases. *Arch Gen Psychiatry*. 1989b;46:1126-34.
 27. Denny-Brown D. HEPATOLENTICULAR DEGENERATION (WILSON'S DISEASE). Two Different Components. *N Engl J Med*. 1964;270:1149-56.
 28. Dufour JF, Kaplan MM. Muddying the water: Wilson's disease challenges will not soon disappear. *Gastroenterology*. 1997;113:348-50.
 29. Ferenci P. Pathophysiology and Clinical Features of Wilson Disease. *Metabol Brain Disease*. 2004;19:229-39.
 30. Figus A, Angius A, Loudianos G, Bertini C, Dessi V, Loi A, Deiana M, Lovicu M, Olla N, Sole G, De Virgillis S, Lilliu F, Farci A MG, Nurchi A, Giachinno R, Barabino A, Marazi M, Zancan L, Greggio NA, Maecellini M, Solinas A, Deplano A, Barbera C, Devoto M, Ozsoylu S, Kocak N, Akar N, Karayalcin S, Mokini V, Cullufi P, Balestrieri A, Cao A, Pirastu M. Molecular pathology and haplotype analysis of Wilson disease in Mediterranean populations. *Am J Hum Genet*. 1995;57:1318-24.
 31. Gibbs KR, Walshe JM. The metabolism of trientine: animal studies. In: Scheinberg IH, Walshe JM, editors. *Orphan diseases and orphan drugs*. Manchester: University Press; 1979. p.33-42.
 32. Gitlin JD, Schroeder JJ, Lee-Ambrose LM, Cousins RJ. Mechanisms of caeruloplasmin biosynthesis in normal and copper-deficient rats. *Biochem J*. 1992;282:835-9.
 33. Gromadzka G, Schmidt HH, Genschel J, Bochow B, Rodo M, Tarnacka B, Litwin T, Chabik G, Czlonkowska A. Frameshift and nonsense mutations in the gene for ATPase7B are associated with severe impairment of copper metabolism and with an early clinical manifestation of Wilson's disease. *Clin Genet*. 2005;68:524-32.

-
34. Grubenbecher S, Stuve O, Hefter H, Korth C. Prion protein gene codon 129 modulates clinical course of Neurological Wilson Disease. *Neuroreport*. 2006;17:549-52.
 35. Hall HC. *La Dégénérescence Hépatolenticulaire. Maladie de Wilson – Pseudo-sclérose*. Paris: Masson; 1921.
 36. Hayashi M, Fuse S, Endoh D, Horiguchi N, Nakayama K, Kon Y, Okui T. Accumulation of Copper Induces DNA Strand Breaks in Brain Cells of Long-Evans Cinnamon (LEC) Rats, An Animal Model for Human Wilson Disease. *Exp Anim*. 2006;55:419-26.
 37. Hermann W, Caca K, Eggers B, Villmann T, Clark D, Berr F, Wagner A. Genotype Correlation with Fine Motor Symptoms in Patients with Wilson's Disease. *Eur Neurol*. 2002;48:97-101.
 38. Homburger F, Kozol HL. Hepatolenticular degeneration. *JAMA*. 1946;130: 6-14.
 39. Hoogenraad T, Van Hattum J, Van den Horner CJ. Management of Wilson's disease with zinc sulphate. Experience in a series of 27 patients. *J Neurol Sci*. 1987;77:137-46.
 40. Hoogenraad T. *Wilson's Disease*. Utrecht: W. B. Saunders Company Ltd; 1996. p.71-108: Clinical Manifestations. (Série Major Problems in Neurology, Vol. 30)
 41. Keller R, Torta R, Lagget M, Crasto S, Bergamasco B. Psychiatric symptoms as late onset of Wilson's disease: neuroradiological findings, clinical features and treatment. *Ital J Neurol Sci*. 1999;20:49-54.
 42. Kitzberger R, Madl C, Ferenci P. Wilson Disease. *Metabol Brain Disease*. 2005;20:295-302.

-
43. Kono S, Miyajima H. Molecular and pathological basis of aceruloplasminemia. *Biol Res.* 2006;39:15-23.
 44. Lang P, Schenck M, Nicolay JP, Becker JU, Kempe D, Lupescu A, Koka S, Eisele K, Klarl BA, Rubben H, Schmid KW, Mann K, Hildenbrand S, Hefter H, Huber SM, Wieder T, Erhardt A, Haussinger D, Gulbins E, Lang F. Liver cell death and anemia in Wilson disease involve acid sphingomyelinase and ceramide. *Nat Med.* 2007;13:164-70.
 45. Lee MS, Kim YD, Lyoo CH. Oculogyric crisis as an initial manifestation of Wilson's disease. *Neurology.* 1999;52:1714-5.
 46. Leggio L, Malandrino N, Loudianos G, Aberavoli L, Lepori MB, Capristo E, De Virgiliis S, Gasbarrini G, Addolorato G. Analysis of the T1288R Mutation of the Wilson Disease ATP7B Gene in Four Generations of a Family: Possible Genotype-Phenotype Correlation with Hepatic Onset. *Dig Dis Sci.* 2007;52:2570-5.
 47. Lewitt P, Pfeiffer R. Neurologic Aspects of Wilson's Disease: Clinical Manifestations and Treatment Considerations. In: Jancovicks JJ, Tolosa E, editors. *Parkinson's disease and Movement Disorders.* Philadelphia: Lippincott Williams& Wilkins; 2002. p.240-55.
 48. Liu XQ, Zhang YF, Liu TT, Hsiao KJ, Zhang JM, Gu XF, Bao KR, Yu LH, Wang MX. Correlation of ATP7B genotype with phenotype in Chinese patients with Wilson disease. *World J Gastroenterol.* 2004;10:590-3.
 49. Lovicu M, Dessi V, Lepori MB, Zappu A, Zanzan L, Giacchino R, Marazzi MG, Iorio R, Vegnente A, Vajro P, Maggiore G, Marcellini M, Barbera C, Kostic V, Farci AM, Solinas A, Altuntas B, Yuce A, Kocak N, Tsezou A, Virgiliis SD, Cao A, Loudianos G. The canine copper toxicosis gene *MURR1* is not implicated in the pathogenesis of Wilson disease. *J Gastroenterol.* 2006;41:582-7.

-
50. Machado A, Chien HF, Deguti MM, Cançado E, Azevedo RS, Scaff M, Barbosa E. Neurological manifestations in Wilson's disease: Report of 119 cases. *Mov Disord.* 2006;21:2192-6
 51. Magalhães ACA, Caramelli P, Menezes JR, Lo LSS, Bacheschi LA, Barbosa ER, Rosemberg LA, Magalhães A. Wilson's disease: MRI with clinical correlations. *Neuroradiology.* 1994;36: 97-100.
 52. Marsden CD. Wilson's Disease. *Quart J Med.* 1987;65:959-66.
 53. Narata AP, Troiano AR, Teive HAG, Werneck LC. Doença de Wilson: Manifestação Clínica Inicial e Apresentação Clínica em 30 pacientes. *O Dendrito.* 2002;8:72-6.
 54. Neter J, Kutner MH, Nachtsheim CJ, Wasserman W. *Applied Linear Statistical Models.* Illinois: McGraw-Hill/Irwin. 1996. p.1408.
 55. Oder W, Grimm G, Kollegger H, Ferenci P, Schneider B, Deecke L. Neurological and neuropsychiatric spectrum of Wilson's disease: a prospective study of 45 cases. *J Neurol.* 1991;238:281-7.
 56. Oder W, Prayer L, Grimm G, Spatt J, Ferenci P, Kollegger H, Schneider B, Gangl A, Deecke L. Wilson's disease: evidence of subgroups derived from clinical findings and brain lesions. *Neurology.* 1993;43:120-4.
 57. Okinaka S, Yoshikawa M, Toyokura Y, Mozai T, Uono M, Kameyama M, Watanabe H, Terao T, Muro T, Igata A, Ogiwara K, Tanabe H, Ueda T, Tsubari T. Studies on hepatocerebral disease. III. Hepatolenticular degeneration in Japan, with studies on copper metabolism. *Neurology.* 1961;11:792-9.
 58. Owen CA. *Wilson's Disease. The Etiology, Clinical Aspects, and Treatment of Inherited Copper Toxicosis.* New Jersey: Neyes; 1981; p.1-22.

-
59. Panagiotakaki E, Tzetis M, Manolaki N, Loudianos G, Papatheodorou A, Manesis E, Arvanitakis SN, Syriopoulou V, Kanavakis E. Genotype-Phenotype Correlations for a Wide Spectrum of Mutations in the Wilson Disease Gene (*ATP7B*). *Am J Med Gen.* 2004;131A:168-73.
 60. Patel BN, Dunn RJ, Jeong SY, Zhu Q, Julien, JP, David S. Ceruloplasmin regulates iron levels in the CNS and prevents free radical injury. *J Neurosci.* 2002;22:6578-86.
 61. Peña MMO, Lee J, Thiele DJ: A delicate balance: Homeostatic control of copper uptake and distribution. *J Nutr.* 1999;129:1251-1260.
 62. Pfeiffer RF. Wilson's Disease. In: Watts RL, Koller WC, editores. *Movement Disorders: Neurologic Principles and Practice*. New York: McGraw - Hill; 2004. p.779-97.
 63. Portala K, Levander S, Westermarck K, Ekselius L, von Knorring L. Pattern of neuropsychological deficits in patients with treated Wilson's disease. *Eur Arch Psychiatr Clin Neurosci.* 2001;251:262-8.
 64. Reed UC, Rosemberg S, Scaff M, Canelas HM, Diamant AJ, Lefèvre AB. Síndrome de Menkes. Revisão da patogenia a propósito de um caso anátomo clínico. *Arq Neuropsiquiatr.* 1984;42:262-73.
 65. Reilly M, Daly L, Hutchinson M. An epidemiological study of Wilson's disease in the Republic of Ireland. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1993;56:298-300.
 66. Rubinstein SS, Young A, Kluin K, Hill G, Aisen AM, Gabrielsein T, Brewer GJ. Clinical Assessment of 31 Patients With Wilson's Disease. Correlations With Structural Changes on Magnetic Resonance Imaging. *Arch Neurol.* 1987;44:365-70.

-
67. Scheinberg IH, Sternlieb I. *Wilson's Disease*. Philadelphia: W. B. Saunders Company Ltd; 1984. (Série Major Problems in Internal Medicine)
 68. Schiefermeier M, Kollegger H, Madl C, Polli C, Oder W, Kuhn H, Berr F, and Ferenci P . The impact of apolipoprotein E genotypes on age at onset of symptoms and phenotypic expression in Wilson's disease. *Brain*. 2000;123:585–90.
 69. Seniow J, Bak T, Gajda J, Poniatowska R, Czlonkowska A. Cognitive functioning in neurologically symptomatic and asymptomatic forms of Wilson's disease. *Mov Disord*. 2002; 17:1077-83.
 70. Senzolo M, Loreno M, Fagioli S, Zanusi G, Canova D, Masiero A, Russo F, Storniolo G, Burra P. Different neurological outcomes of liver transplantation for Wilson's disease in two homozygotic twins. *Clin Neurol Neurosurg*. 2007;109:71-5.
 71. Sibon I, Burbaud P. Risus Sardonicus After Thalamic Haemorrhage. *Mov Disord*. 2004;19:829-31.
 72. Shah AB, Chernov I, Zhang HT, Barbara MR, Kamna Das, Lutsenko S, Parano E, Pavone L, Evgrafov O, Ivanova-Smolenskaya IA, Annerén G, Westermarck K, Urrutia H, Penchaszadeh GK, Sternlieb I, Scheinberg H, Gilliam C, Petrukhin K. Identification and analysis of mutations in the Wilson disease gene (ATP7B): population frequencies, genotype-phenotype correlation, and functional analyses. *Am J Hum Genet*. 1997;61:317-28.
 73. Stapelbroek JM, Bollen CW, van Amstel JK, van Erpecum KJ, van Hattum J, van den Berg LH, Klomp LW, Houwen RH. The H1069Q mutation in ATP7B is associated with late and neurologic presentation in Wilson disease: results of a meta-analysis. *J Hepatol*. 2004;41:758-63.

-
74. Steindl P, Ferenci P, dienes HP, Grimm G, Madl C, Maier-Dobersberger T, Herneth A, Dragosics B, Meryn S, Knoflach P, Grandtsch G, Gauge A. Wilson's disease in patient presenting with liver disease: a diagnostic challenge. *Gastroenterology*. 1997;113:212-8.
 75. Strickland GT, Leu ML. Wilson's disease: clinical and laboratory manifestations in 40 patients. *Medicine*. 1975;54:113-37.
 76. Stremmel W, Meyerrose KW, Niederau C, Hefter H, Kreuzpaintner G, Strohmeyer G. Wilson Disease: Clinical Presentation, Treatment, and Survival. *Ann Intern Med*. 1991;115:720-726.
 77. Strümpell A. Über die Westphal'sche Pseudosklerose und über diffuse Hirnsklerose, insbesondere bei Kindern. *Dtsch Z Nervenhe*. 1898;12:116-49.
 78. Stuehler B, Reichert J, Stremmel W, Schaefer M. Analysis of the human homologue of the canine copper toxicosis gene *MURRI* in Wilson disease patients. *J Mol Med*. 2004;82:629-34.
 79. Svetel M, Kozic D, Stefanova E, Semnic R, Dragasevic N, Kostic VS. Dystonia in Wilson's disease. *Mov Disord*. 2001;16:719-23.
 80. Tanzi RE, Petrukhin K, Chernov I, Pellequer JL, Wasco W, Ross B, Romano DM, Parano E, Pavone L, Brzustowicz LM. The Wilson disease gene is a copper transporting ATPase with homology to the Menkes disease gene. *Nat Genet*. 1993;5:344-50.
 81. Thomas GR, Forbes JR, Roberts EA, Walshe JM, Cox DW. The Wilson disease gene: spectrum of mutations and their consequences. *Nat Genet*. 1995;9:210-7.
 82. Türk-Börü U, Kocer A, Alp R, Gümüş M, Gümüş M. Status epilepticus in a case of Wilson's disease during D-penicillamine treatment. *Swiss Med Wkly*. 2003;133:446-7.

-
83. Valentine JS and Gralla B. Delivering copper inside yeast and human cells. *Science*. 1997;278:817-8.
 84. Vrabelova S, Letocha O, Borsky M, Kozak L. Mutation analysis of the ATP7B gene and genotype/phenotype correlations in 227 patients with Wilson disease. *Mol Genet Metabol*. 2005;86:277-85
 85. Waldenstrom E, Lagerkvist A, Dahlman T, Westermark K, Landegren U. Efficient detection of mutations in Wilson disease by manifold sequencing. *Genomics*. 1996;37:303-9
 86. Wang S, Lewis CM, Jakobsson M, Ramachandran S, Ray N, Bedoya G, Rojas W, Parra MV, Molina JA, Gallo C, Mazzotti G, Poletti G, Hill K, Hurtado AM, Labuda D, Klitz W, Barrantes R, Bortolini MC, Salzano FM, Petzl-Erler ML, Tsuneto LT, Llop E, Rothhammer F, Excoffier L, Feldman MW, Rosenberg NA, Ruiz-Linares A. Genetic variation and population structure in native Americans *PLoS Genet*. 2007;3:2049-67
 87. Westphal C. Über eine dem Bilde der cerebrospinalen grauen Degeneration ähnliche Erkrankung des centralen Nervensystems ohne anatomische Befund nebst einigen Bemerkungen über paradoxe Contraction. *Arch Psychiat Nervenkrh*. 1883;14:87-134.
 88. Wilson SA. Progressive lenticular degeneration: a familial nervous disease associated with cirrhosis of the liver. *Brain*. 1912;34:295-507.
 89. Yamaguchi Y, Heny ME, Gitlin JD. Isolation and characterization of a human liver cDNA as a candidate gene for Wilson Disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993;197:271-7.

-
90. Yang XL, Miura N, Kawarada Y, Terada K, Petrukhin K, Gilliam C, Sugiyama T. Two forms of Wilson disease protein produced by alternative splicing are localized in distinct cellular compartments. *Biochem J.* 1997;326:897-902.
 91. Youssef ME. Wilson Disease. *Mayo Clin Proc* 2003; 78: 1126-1136.
 92. Yorio AA, Mesri JC, Pagano MA, Lera G. Stereotypies in Wilson's Disease. *Mov Disord.* 1997;12:614-6.
 93. Walshe JM. Wilson's disease. In: Vinken PJ, Bruyn GW, Klawans HI, editores. *Handbook of clinical neurology.* Amsterdam: Elsevier; 1986. v.5 (49), p. 223-38.
 94. Walshe JM. History of Wilson's Disease: 1912 to 2000. *Mov Disord* 2006;21:142-7.
 95. Wennig GK, Geser F, Poewe W. The 'Risus Sardonius' of Multiple System Atrophy. *Mov Disord.* 2003;18:1211.
 96. Wilson SAK. Progressive lenticular degeneration: a familial nervous disease associated with cirrhosis of the liver. *Brain.* 1912;34:295-507.